

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

“Tratamiento de agua dulce contaminada con hidrocarburos del tipo de las gasolinas y su remediación a partir de *Pseudomonas aeruginosa* con nanojets comerciales”

TESIS QUE PRESENTA

ING. ISRAEL BENÍTEZ PÉREZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA
AMBIENTALES**

DIRECTORES:

M. en I. MARÍA BERENICE GUADALUPE QUINTANA DÍAZ

Dr. JOSÉ LUIS CONTRERAS LARIOS

Ciudad de México, Julio 2016.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del Dr. Gerardo Aparicio Ozoers y en el Laboratorio de Cromatografía de Gases del Departamento de Ciencias Básicas de la Unidad Azcapotzalco de la Universidad Autónoma Metropolitana bajo la asesoría de la Dra. Elizabeth Rojas García.

El sustentante disfrutó de una beca CONACYT número 379754 durante sus estudios de enero de 2014 a diciembre de 2015.

“Nadie es ambientalista de nacimiento.
Es solo tu camino, tu vida y
tus viajes lo que te despierta”
Yann Arthus-Bertrand.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias e Ingeniería Ambientales de la DCBI-UAM-A y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Doctor Gerardo Aparicio Ozores.

A la Maestra María Berenice Guadalupe Quintana Díaz y al Doctor José Luis Contreras Larios.

A la Doctora Elizabeth Rojas García de Ciencias Básicas de la UAM-AZC.

A mis compañeros de generación de la Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales.

A mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la ENCB-IPN.

Al Personal del Laboratorio de Protección y Control de Biológicos del Departamento de Microbiología de la ENCB-IPN.

Al Personal de Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Microbiología de la ENCB-IPN.

Al Ingeniero José Luis Sepúlveda Rivera de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria.

DEDICATORIAS

A Lidia y Yaretzi.

CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ABREVIATURAS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| RESUMEN | xi |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1 Las gasolinas | 2 |
| 2.2 La bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 |
| 2.2.1 Características: | 6 |
| 2.2.2 Fuentes y prevalencia | 6 |
| 2.2.3 Plásmidos | 6 |
| 2.2.4 Formación de biopelículas | 6 |
| 2.2.5 Eliminación de alcanos | 7 |
| 2.3 Nanojets comerciales | 7 |
| 2.3.1 Estructura de los NTC | 8 |
| 2.3.2 Descarga de arco | 10 |
| 2.3.3 Pirólisis de hidrocarburos (deposición química de vapor) | 10 |
| 2.4 Estado del arte | 11 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 4. HIPÓTESIS | 14 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 15 |
| 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 7. METODOLOGÍA | 16 |
| 7.1 Muestreo in situ | 16 |
| 7.2 Material Biológico | 17 |
| 7.3 Experimentos de remediación en Biorreactores | 20 |
| 7.4 Determinación del crecimiento bacteriano | 21 |
| 7.5 Análisis de la gasolina | 22 |
| 8. RESULTADOS | 25 |
| 8.1 Compuestos identificados en la muestra de gasolina Premium | 25 |
| 8.2 Curvas de calibración de los compuestos puros grado reactivo | 26 |
| 8.3 Compuestos identificados en la muestra simple del agua del arroyo Hondo | 29 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.4 Resultados obtenidos en los experimentos de los biorreactores..... | 30 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 35 |
| 10. CONCLUSIONES | 38 |
| 11. PROSPECTIVAS | 39 |
| 12. REFERENCIAS..... | 40 |
| 13. ANEXOS | 44 |
| Anexo 1. Compuestos identificados en la gasolina Premium por familia PIANO | 44 |
| Anexo 2. Ejemplos de compuestos pertenecientes a las familias PIANO..... | 47 |
| Anexo 3. Curvas de calibración de compuestos puros | 49 |
| Anexo 4. Cromatogramas de los compuestos puros grado reactivo..... | 52 |
| Anexo 5. Cromatogramas de los experimentos de los muestreos..... | 56 |

ABREVIATURAS

?: Porcentaje

°C: Grados Celsius

Ar: Argón

ASTM: Sociedad Americana para Pruebas y Materiales

ATCC: Colección Americana de Tipos de Cultivo

BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno

C: átomos de carbono

Cm: centímetros

Cm³: centímetros cúbicos

CO: monóxido de carbono

CO₂: Bióxido de Carbono

Cu: Cobre

DCBI: Dirección de Ciencias Básicas e Ingeniería

ENCB: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

EPA: Agencia de Protección Ambiental

etc.: Etcétera

Fe: Hierro

FID: Detector de Ionización de Flama

Ft: Pie

g: Gramos

H: hora u horas

H₂O: Agua

H₂O₂: Agua Oxigenada

He: Helio

IMP: Instituto Mexicano del Petróleo

in: Pulgada

IPN: Instituto Politécnico Nacional

Km: kilómetros

LIAT: Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica

m: Metro

m³: Metro Cúbico

Max: máximo

ml: Mililitro
ml/min: mililitros por minuto
mm: Milímetro
MTBE: Metil-Terbutil Éter
m-Xileno: meta xileno
Ni: Níquel
nm: Nanómetro
Nm: nanómetros
NTC: Nanotubos de Carbono
NTCPM: Nanotubos de carbono de pared múltiple
NTCPS: Nanotubos de carbono de pared simple
O₂: Oxígeno
o-xileno: orto xileno
p.p.m.: Partes Por Millón
P: Pseudomonas
Pa: Pascal
Pd: Paladio
Pemex: Petróleos Mexicanos
pH: potencial de hidrógeno
pH: Potencial de Hidrógeno
PIANO: Parafinas, Isoparafinas, Aromáticos, Naftenos y Olefinas
Ppm: partes por millón
PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
psi: Libra por Pulgada Cuadrada
Pt: Platino
p-Xileno: para xileno
Rpm: Revoluciones por minuto
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
SGA: Sistema de Gestión Ambiental
T. R.: Tiempo de Retención
TPHs: Hidrocarburos Totales de Petróleo
TSA: Agar de Soya Trypticaseína
U. A.: Unidades de Área.
UAM-A: Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Vol: volumen

ZMVM: Zona Metropolitana del Valle de México

γ : Gama

μm : Micrómetros

μV : Microvolts

ÍNDICE DE FIGURAS

| Número de Figura | Título | Página |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Manchas de derrame de hidrocarburos | 3 |
| 2 | Electromicrografía de la <i>P. aeruginosa</i> | 5 |
| 3 | Modelo de fullereno | 8 |
| 4a | Nanotubos de carbono de pared múltiple | 8 |
| 4b | Nanotubos de carbono de pared simple | 8 |
| 5a | Estructura de lámina de grafito | 9 |
| 5b | Enrollamiento en forma zigzag | 9 |
| 5c | Enrollamiento en forma chiral | 9 |
| 5d | Enrollamiento en forma armchair | 9 |
| 6 | Complejo lisozima-NTC | 11 |
| 7 | Ubicación geográfica del sitio de muestreo | 16 |
| 8 | Imagen del sitio de muestreo | 16 |
| 9 | Cultivo preparado en placa de Petri | 18 |
| 10 | Crecimiento de la <i>P. aeruginosa</i> | 18 |
| 11 | Confirmación con luz UV de la pigmentación | 19 |
| 12 | Vista a contraluz para observar la pigmentación | 19 |
| 13 | Vista en microscópica de la tinción de Gram | 20 |
| 14 | Montaje de biorreactores en el Shaker | 20 |
| 15 | Agitación de biorreactores en el Shaker | 21 |
| 16 | Placa de Petri con cuadrantes para conteo de colonias | 22 |
| 17 | Toma de muestras para análisis cromatográfico | 23 |
| 18 | Toma de muestras para análisis cromatográfico | 23 |
| 19 | Toma de muestras para cultivo bacteriano | 23 |
| 20 | Carrusel porta viales con muestras para análisis cromatográfico | 24 |
| 21 | Cromatógrafo HP 6890 con FID | 24 |
| 22 | Cromatograma de la gasolina Premium | 25 |
| 23 | Curva de calibración para el benceno | 26 |
| 24 | Curva de calibración para el tolueno | 26 |
| 25 | Curva de calibración para el m-xileno | 27 |
| 26 | Curva de calibración para el p-xileno | 27 |
| 27 | Curva de calibración para el o-xileno | 28 |
| 28 | Cromatograma del agua del arroyo Hondo | 29 |
| 29 | Eliminación del benceno en los experimentos de los 3 sistemas | 30 |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 30 | Eliminación del tolueno en los experimentos de los 3 sistemas | 31 |
| 31 | Eliminación del m-xileno en los experimentos de los 3 sistemas | 32 |
| 32 | Eliminación del p-xileno en los experimentos de los 3 sistemas | 32 |
| 33 | Eliminación del o-xileno en los experimentos de los 3 sistemas | 33 |
| 34 | Compuestos que pertenecen a las parafinas | 47 |
| 35 | Compuestos que pertenecen a las isoparafinas | 47 |
| 36 | Compuestos que pertenecen a las olefinas | 47 |
| 37 | Compuestos que pertenecen a los naftenos | 47 |
| 38 | Compuestos que pertenecen a las aromáticos | 48 |
| 39 | Cromatograma del n-pentano grado reactivo | 52 |
| 40 | Cromatograma del n-hexano grado reactivo | 53 |
| 41 | Cromatograma del n-heptano grado reactivo | 54 |
| 42 | Cromatograma del ciclohexano grado reactivo | 55 |
| 43 | Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 56 |
| 44 | Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 57 |
| 45 | Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 58 |
| 46 | Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 59 |
| 47 | Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 60 |
| 48 | Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 61 |
| 49 | Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 62 |
| 50 | Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 63 |
| 51 | Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 64 |
| 52 | Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 65 |
| 53 | Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 66 |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 54 | Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 67 |
| 55 | Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 68 |
| 56 | Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 69 |
| 57 | Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 70 |
| 58 | Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 71 |
| 59 | Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 72 |
| 60 | Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 73 |
| 61 | Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 74 |
| 62 | Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 75 |
| 63 | Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 76 |
| 64 | Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 77 |
| 65 | Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 78 |
| 66 | Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 79 |
| 67 | Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 80 |
| 68 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 81 |
| 69 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 82 |
| 70 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 83 |
| 71 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 84 |

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 72 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina. | 85 |
| 73 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 86 |
| 74 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 87 |
| 75 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 88 |
| 76 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 89 |
| 77 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina. | 90 |
| 78 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 91 |
| 79 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 92 |
| 80 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 93 |
| 81 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 94 |
| 82 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina. | 95 |
| 83 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 96 |
| 84 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 97 |
| 85 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 98 |
| 86 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 99 |
| 87 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina. | 100 |
| 88 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 101 |
| 89 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 102 |

| | | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 90 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 103 |
| 91 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 104 |
| 92 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina. | 105 |
| 93 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina. | 106 |
| 94 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina. | 107 |
| 95 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina. | 108 |
| 96 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina. | 109 |
| 97 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina. | 110 |
| 98 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina. | 111 |
| 99 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina. | 112 |
| 100 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina. | 113 |
| 101 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina. | 114 |
| 102 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina. | 115 |
| 103 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina. | 116 |
| 104 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina. | 117 |
| 105 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina. | 118 |
| 106 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina. | 119 |
| 107 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina. | 120 |

| | | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 108 | Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina. | 121 |
| 109 | Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina. | 122 |
| 110 | Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina. | 123 |
| 111 | Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina. | 124 |
| 112 | Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina. | 125 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Número de Tabla | Título | Página |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1 | Composición de la gasolina | 2 |
| 2 | Propiedades generales de los nanotubos de carbono | 9 |
| 3 | Estado del arte | 11 – 12 |
| 4 | Contenido del agar base cetrimida | 17 |
| 5 | Técnicas para la determinación del crecimiento | 19 |
| 6 | Cantidades de gasolina y condiciones de experimentos en biorreactores | 21 |
| 7 | Compuestos identificados en la gasolina Premium por familia (PIANO) | 44 – 46 |
| 8 | Resultados de porcentaje de los compuestos identificados en la gasolina Premium por familia (PIANO) | 46 |
| 9 | Promedios para la curva de calibración del benceno | 49 |
| 10 | Promedios para la curva de calibración del tolueno | 49 |
| 11 | Promedios para la curva de calibración del m-xileno | 50 |
| 12 | Promedios para la curva de calibración del p-xileno | 50 |
| 13 | Promedios para la curva de calibración del o-xileno | 51 |

RESUMEN

El presente estudio muestra cómo se llevó a cabo la eliminación de gasolina tipo Premium que contaminó el agua del arroyo Hondo del estado de Veracruz por un derrame en una toma clandestina del poliducto Minatitlán-México; para lograr la eliminación se utilizó la combinación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con nanojets comerciales, utilizando biorreactores de vidrio en agitación constante (180 rpm), a temperatura constante de 26 ± 2 °C con un volumen de control de 1000 ml, por un periodo de 28 días con muestreos a 0, 7, 14, 21 y 28 días. Se estudiaron tres sistemas: uno de ellos sin microorganismos variando la concentración de gasolina Premium de 0, 15, 25, 35, 45%vol adicionando 1% de emulsificante Tritón X-100. El otro sistema con 0, 15, 25, 35, 45%vol de gasolina Premium se añadió la bacteria *P. aeruginosa* en una proporción de 1×10^6 UFC más 1% de emulsificante Tritón X-100. También se investigó el efecto de la adición de nanotubos de carbono en el proceso de eliminación utilizando cuatro biorreactores a los que se les agregó 1400 microgramos de nanojets comerciales. La concentración de gasolina y la cantidad de nanojets fueron las variables estudiadas en el diseño de experimentos. Al ser la gasolina una mezcla de varios hidrocarburos, se cuantificó el proceso de eliminación de: benceno, tolueno, m-Xileno, p-Xileno y o-Xileno por ser los más dañinos para los seres vivos. De acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó que la gasolina se elimina a partir de los 14 días, obteniendo su valor óptimo a 21 y 28 días. Lo cual confirma que el uso del microorganismo fue adecuado para su eliminación. Aun cuando el análisis se realizó por un periodo de 28 días, los microorganismos continuaron creciendo y manteniéndose activos, esto se comprobó por medio de la cromatografía de gases con detector de Ionización de Flama (FID) que permitió identificar los compuestos que no se eliminaron en su totalidad. A partir de los resultados obtenidos se comprobó la existencia del m-xileno a los 21 días y en mayor proporción a los 28 días, que es un producto de la reacción del tolueno que por el proceso de desproporción forma metano y benceno. La eficiencia de la eliminación de benceno por muestreo alcanzó hasta 43.3% para el día 28 con nanojets.

ABSTRACT

This study shows how carried out the degradation of premium gasoline present in the fresh water from a polluted stream of Veracruz state by a stroke in a clandestine takeover of Minatitlan-Mexico pipeline; to achieve the elimination through the combination of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and commercial nanojets, using biorreactors of glass in constant stirring (180 rpm) at constant temperature of 26 ± 2 °C with a volume control of 1000 ml and a sampling total period of 28 days with sampling time at 0, 7, 14, 21 and 28 days. Two systems were studied: the first system was studied without microorganisms varying the concentration of premium gasoline of 0, 15, 25, 35, 45% volume and adding 1% of Triton X-100 emulsifier. The other one was studied using the *P. aeruginosa* bacteria with different concentration of premium gasoline of 0, 15, 25, 35, 45% volume and was added in a proportion of 1×10^6 CFU and 1% of Triton X-100 emulsifier. Also was studied the effect of carbon nanotubes on the degradation process using four biorreactors in which were added 1400 micrograms of functionalized nanotube with hydrogen peroxide at 3% volume. In the design of experiments were studied the variables of concentration of the gasoline and mass of the nanojets. The gasoline consists of a mixture of hydrocarbons including, benzene, toluene, m-xylene, p-xylene and o-xylene which are harmful to our health so that was evaluated the degradation process and quantification. According to the results obtained, the process of gasoline degradation was found after 14 days, obtaining the optimal degradation at 21 and 28 days. This confirms that the use of the microorganism was suitable for the degradation as long as nutritional sources are maintained. Even if the analysis was performed at 28 days, the microorganisms continued to grow and active. Gas chromatography with Flame Ionization Detector (FID) allowed identified the compounds that were not degraded in their entirety. The results confirmed the presence of m-xylene at 21 days and most to 28 days, which is a reaction product of toluene disproportionation process at methane and benzene. The efficiency of sample degradation of benzene reached up to 43.3% for 28 with nanojets.

1. INTRODUCCIÓN

El derrame de hidrocarburos, especialmente del tipo de las gasolinas propicia la contaminación del suelo, del agua de mares y ríos, ocasionando una pérdida de la diversidad biológica de ecosistemas que sirven de sostén al equilibrio ecológico, alterando el estado físico y químico de los suelos y del aire, además de la eliminación de la calidad del agua (Osuna et al., 2010).

Es evidente que tanto a nivel nacional como internacional, las demandas de energía por parte de la sociedad actual han provocado un alto impacto al medio ambiente con afectaciones considerables a los ecosistemas, a la salud y a la economía. Esta contaminación provocada por las gasolinas afecta a elementos bióticos (flora y fauna), elementos abióticos (suelo, relieve, geomorfología), la salud del ser humano (sistema nervioso, respiratorio y digestivo) y sus actividades (pesca, agricultura, lugares de esparcimiento, lugares de turismo) (Borrás, 2012).

Una de las preocupaciones de las autoridades ambientales es el desarrollo de tecnologías eficientes y económicamente factibles que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes. Lo que representa una problemática ambiental debido a que en ocasiones no se remedia o en algunos casos esta remediación es parcial, quedando grandes cantidades de estos contaminantes sin tratamiento, lo que provoca una considerable cantidad de residuos peligrosos (Volke y Velasco, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1 Las gasolinas

Las gasolinas son una mezcla de hidrocarburos que pueden formularse con la combinación de cualquiera de los grupos de hidrocarburos conocidos químicamente, estos son: parafinas, isoparafinas, aromáticos, nafténicos y olefinas (PIANO). La diferencia que tiene cada uno de estos grupos consiste en su relación de átomos de carbono e hidrógeno presentes en su molécula que van de C_5 a C_{12} (Ver tabla 1) (Anuario estadístico PEMEX 2004).

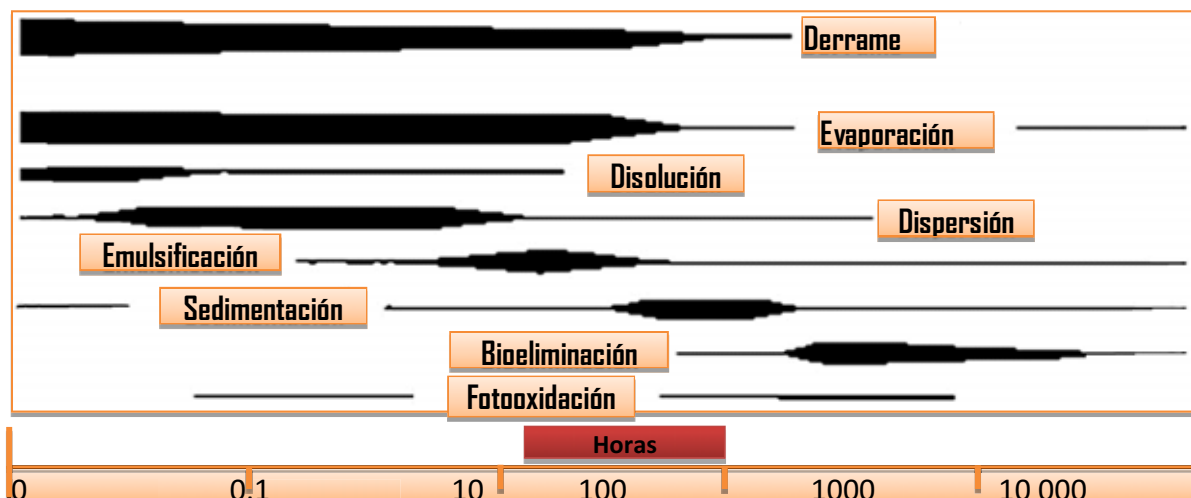
Tabla 1. Composición de la gasolina Premium.

| Componente | % vol. |
|------------|-----------------------|
| Gasolina | 100 |
| Aromáticos | 25 % vol. máx. |
| Olefinas | 10% vol. máx. |
| Benceno | 1.0% vol. máx. |
| Oxígeno | 1.0 – 2.7 % vol. máx. |

Fuente: Hojas de Seguridad. PEMEX 2004.

México en 2013 reportó 157 fugas de hidrocarburos, de las cuales 90 de ellas ocurrieron en ductos de Petróleos Mexicanos (PEMEX). Existiendo diversos derrames durante 2014, en el mes de agosto en una toma clandestina en el poliducto Minatitlán-México, ubicado a 100 km de la capital veracruzana ocurrió un derrame de gasolina Premium contaminando el arroyo Hondo en el municipio de Tierra Blanca. Alterando la calidad de vida de la biodiversidad y/o la mortandad de varias especies que forman parte del ecosistema local (Anuario estadístico PEMEX 2015).

Cuando la gasolina es derramada sobre la superficie del agua se extiende de inmediato, su dispersión está determinada por varios factores medioambientales: velocidad y rumbo de la corriente, velocidad y dirección del viento. En ausencia de viento, la gasolina se moverá, normalmente, con la misma velocidad y en la misma dirección que la corriente, sin embargo su efecto sí es importante en relación con la dispersión y el proceso de envejecimiento. Un derrame de gasolina se extiende hasta llegar a formar una capa muy extensa en manchas espesas, grumosas con diferente grosor. De esta forma 1 m^3 de gasolina puede llegar a formar una mancha de más de 100 m de diámetro y en las partes más finas 0.1 mm de espesor, (Ver Figura 1) (Dieckmann et al., 2003).



Dónde: el eje de las ordenadas corresponde a las etapas de dispersión y el eje de las abscisas al tiempo (h).

Figura 1. Mancha de derrame de hidrocarburo del tipo de gasolinas. Fuente: Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente.

En la remediación de sitios contaminados con gasolina, se utilizan procesos biológicos por ser más prácticos y económicamente factibles, debido a la capacidad de los microorganismos para degradar residuos aceitosos a productos inocuos (dióxido de carbono CO_2 , agua H_2O y biomasa) a través de reacciones bioquímicas. La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para limpiar entornos contaminados, y se lleva a cabo en ambientes abiertos o cerrados no estériles, en los que participan una gran variedad de microorganismos (Ferrera-Cerrato et al., 2006).

De éstos, las bacterias son las más estudiadas, mientras que los hongos y los protozoos han demostrado tener también un efecto fundamental para el desarrollo del proceso. Por lo tanto es necesario desarrollar un conocimiento más profundo de la ecología microbiana de los sitios contaminados y de los procesos de biorremediación, incluyendo tecnologías de biología molecular para su identificación y estudio, ya que los microorganismos en las poblaciones naturales son mucho más diversos que los que se pueden cultivar en los laboratorios y los identificados en los procesos de biorremediación de oxidación de metano, eliminación de las gasolinas y de residuos en general. Los microorganismos utilizados pueden ser los ya existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados (Bouza et al., 2009).

Los microorganismos utilizados en biorremediación son generalmente no-fotosintéticos; ecológicamente ocupan el nivel trófico (de alimentación) denominado descomponedores, en el que los hongos y bacterias son los principales componentes. Estos organismos están presentes en prácticamente todos los lugares del planeta, inclusive a profundidades y temperaturas que se creía estaban libres de ellos, como los pozos petroleros profundos (Chugani et al., 2001).

En un microorganismo, las enzimas son las encargadas de realizar la bioeliminación, estas proteínas son de varios tipos, tales como: monoxigenasas, dioxigenasas, ligninasas, ligninoperoxidasas, polifenol oxidasas y lacasas según el sustrato sobre el que van a actuar. La temperatura influye en la velocidad de eliminación, dependiendo del tipo de microorganismo. Comúnmente las temperaturas adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C (microorganismos mesófilos), aunque se han descrito algunos trabajos de biorremediación con microorganismos hemofílicos extremos y psicrófilos (Collins & Avouris, 2000).

2.2 La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

La bacteria (*P. aeruginosa*) pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* de la rama “γ” de las proteobacterias misma a la que pertenecen las enterobacterias y es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar (Ver Figura 2). Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *P. aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono (Dasgupta, 2000).

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y jabón, tienen una distribución globalizada, se le considera como una bacteria cosmopolita (Das & Mukherjee, 2005 y Das & Mukherjee, 2006).

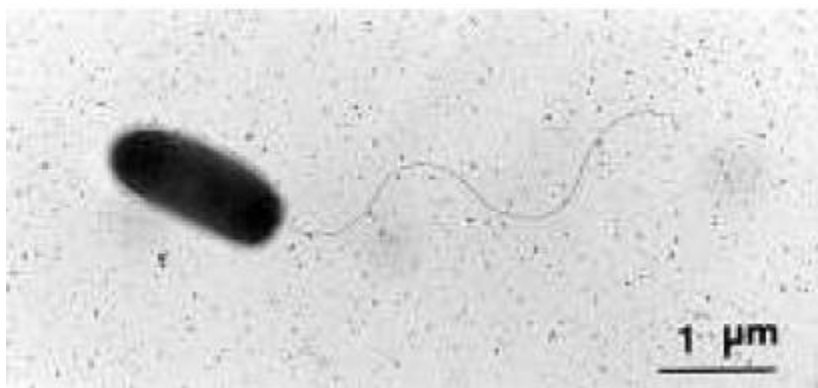


Figura 2. Electromicrografía de *Pseudomonas aeruginosa*. Se muestra la flagelación polar que presenta la bacteria. Fuente: Ruíz, 2007.

Se encuentra en bajas cantidades en los alimentos y en algunos artículos de limpieza. Se obtienen aislamientos de esta bacteria de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas pero representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados y los enfermos de fibrosis quística (DeLano, 2007; Demaneche et al., 2001).

Para esta bacteria, la humedad es un factor benéfico, como lo son los reservorios en hospitales e incluso soluciones desinfectantes y lugares donde el agua se encuentra estancada. En ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula (Echeverri et al., 2011).

Sin embargo, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental, es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, que produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados y que produce enzimas, como la lipasa, con distintas aplicaciones potenciales (Fan et al., 2003).

Son de fácil cultivo *in vitro* y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas. En agar simple forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco. El pigmento (piocianina) se difunde en el medio dándole una tonalidad verdosa. Este pigmento tiene cualidades bactericidas sobre otras bacterias Gram positivas y Gram negativas (Frank et al., 2004).

2.2.1 Características:

- La bacteria *P. aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo medición de 0.5 a 0.8 micras por 1.5 a 3.0 micras. Casi todas las cepas son móviles por medio de un solo flagelo polar.
- Tiene requerimientos nutricionales muy simples. Con frecuencia se observa "que crece en agua destilada", que es la evidencia de sus necesidades nutricionales son mínimas. En el laboratorio, el medio más simple para el crecimiento de *P. aeruginosa* consta de acetato como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.
- Posee versatilidad metabólica (factores de crecimiento orgánico).
- Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C y es capaz de crecer a temperaturas tan altas como 42 °C.
- Es tolerante a una amplia variedad de condiciones físicas, incluyendo la temperatura.
- Es resistente a las altas concentraciones de sales y colorantes, antisépticos débiles, y muchos antibióticos usados comúnmente.
- Tiene una predilección por el crecimiento en ambientes húmedos, lo cuales probablemente un reflejo de su existencia natural en el suelo y el agua.
- Estas propiedades naturales de la bacteria, contribuirán a su éxito ecológico (Frey & Doren, 2005).

2.2.2 Fuentes y prevalencia

La bacteria *P. aeruginosa* es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua (Giraldo et al., 2014).

2.2.3 Plásmidos

Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Está codificada en plásmidos, llamados catabólicos. Su enorme versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican para enzimas (Fan et al., 2003).

2.2.4 Formación de biopelículas

Cuando *P. aeruginosa* se adhiere a una superficie, las células se diferencian para formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una

película. Las biopelículas tienen una estructura muy compleja, en la que se pueden distinguir canales por los que se intercambian oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa. La matriz extracelular está constituida en parte por alginato. Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos (llamadas planctónicas), una de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos. Se considera que la mayor proporción de las células de *P. aeruginosa* que viven en el medio ambiente se encuentran formando biopelículas (Galván et al., 2007).

Las aplicaciones biotecnológicas de los ramnolípidos son múltiples, pero su principal utilidad es la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos (Bracho et al., 2004) o con metales pesados (Fan et al., 2003).

2.2.5 Eliminación de alcanos

Algunos hidrocarburos se acumulan en el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad. Este es el caso de los alcanos y alquenos de cadena ramificada, especialmente aquellos con terminaciones en tres metilos o con carbonos cuaternarios. Se han reportado cepas de *P. aeruginosa* que tienen la capacidad de degradar este tipo de compuestos y que, por tanto, son útiles en la limpieza de sitios contaminados con estos compuestos (Erdogan et al., 2013).

2.3 Nanojets comerciales

Los nanotubos de carbono (NTCs) son nuevas formas de carbono como agujas de grafito con diámetros comprendidos entre 4 y 30 nm y longitudes mayores a 1 μ m, cada una de ellas compuestas por varios tubos coaxiales (entre 2 y 50), con estructura de hexágonos de carbono enrollados de manera helicoidal, son insolubles en la mayoría de los disolventes comunes; sin embargo, pueden volverse solubles en disolventes orgánicos y en soluciones acuosas. A este proceso se le llama funcionalización y los NTCs funcionalizados pueden ser posteriormente conjugados con aminoácidos, péptidos bioactivos, proteínas y otras moléculas, encontrando así un gran número de aplicaciones biológicas potenciales (Harris et al., 2002).

Sin embargo, estas nuevas micromoléculas eran pequeños tubos, que en sus polos tenían lo que parecía ser la mitad de un fullereno así se realizó el descubrimiento de los primeros NTCs, los cuales eran de pared múltiple (NTCPM; Figura 4a), que consistían en varios tubos acomodados entre ellos en forma concéntrica. En 1993 se descubrieron los primeros NTC de

pared simple (NTCPS; Figura 4b), la forma más sencilla de NTC, que consiste en un solo tubo, sin más capas que la del tubo mismo (Leadbetter, 2002).

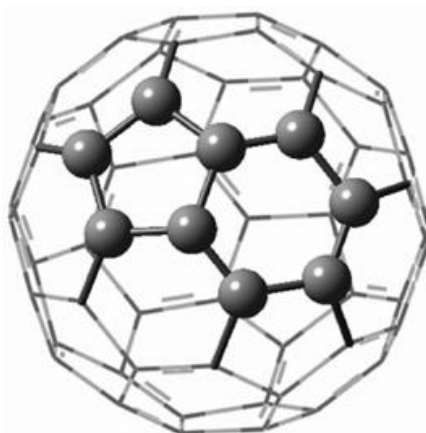


Figura 3. Representación de un fullereno, obtenida por computadora utilizando el programa Gaussian 03W.

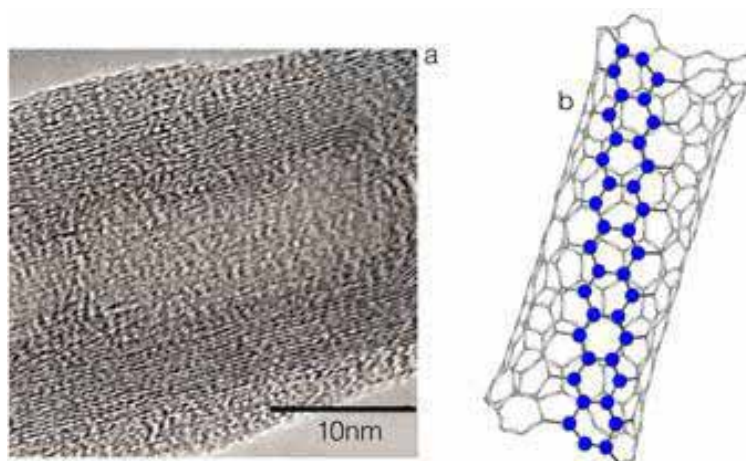


Figura 4. Nanotubos de carbono. a) Multipared o NTCMP (microfotografía proporcionada por Judith Tánori, Departamento de Física, Universidad de Sonora, México); y b) de pared simple o NTCPS (modelado con el programa Gaussian 03W).

2.3.1 Estructura de los NTC

Llamados anteriormente nanocables fullerénicos o fullerenos cilíndricos. La estructura de ambos tipos de NTCs (NTCPS y NTCMP) consta de enlaces puros de carbono unidos entre sí por un enlace covalente híbrido sp^2 y se caracterizan por tener propiedades eléctricas, mecánicas, ópticas, térmicas, y electrónicas inusuales (Ver Tabla 2), a partir de las cuales se predicen aplicaciones biológicas (Lopolito et al., 2011 y Loya del Ángel, 2013).

La morfología de los NTCs está dictada por el ángulo de enrollamiento respecto a los hexágonos formados por los enlaces de carbono. Existen tres morfologías de los NTC (Figura 5), que son: *armchair*, *chiral* y *zig-zag*. Para este estudio se utilizaron NTCPM por tener propiedades como la catalasa similares a las de *P. aeruginosa* (Lin et al., 2004).

Tabla 2. Propiedades Generales de los Nanotubos de Carbono*

| Propiedades | NTC | Comparación |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Diámetro | 0,4-5nm | La litografía de haz electrónico puede crear líneas de 50nm de ancho. |
| Densidad | 1,33-1,40g·cm ⁻³ | El aluminio tiene una densidad de 2,7g·cm ⁻³ . |
| Fuerza de tensión | 45·10 ¹² Pa | Las aleaciones de acero de alta resistencia se quiebran cuando se les aplica una fuerza de ~2·10 ¹² Pa. |
| Resistencia | Pueden ser doblados en ángulos grandes y volver a su estado normal sin sufrir daño. | Los metales y las fibras de carbono se fracturan cuando se someten a esfuerzos similares. |

* Adaptado de (Collins y Avouris, 2000) ¹www.electronics.ca/presscenter/articles/743/1/ (Rev. 04/03/2008).

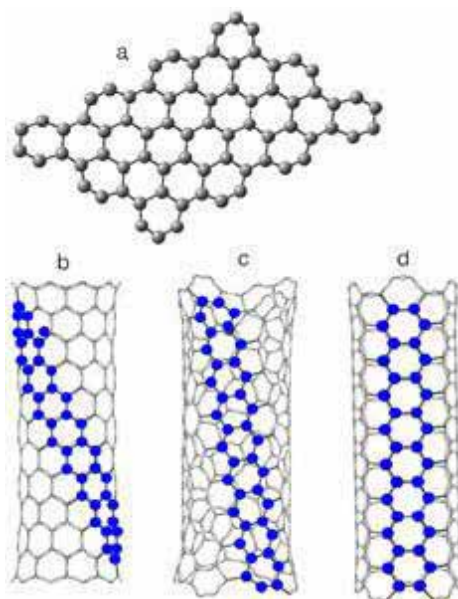


Figura 5. Morfología de los NTC según el ángulo de enrollamiento de la lámina de grafito, modelados con el programa Gaussian 03W. Estructura de la lámina de grafito (a) y enrollamientos con morfología tipo zigzag (b), *chiral* (c) y *armchair* (d).

2.3.2 Descarga de arco

Los NTCs pueden ser sintetizados de pared simple y múltiple (NTCPS o NTCPM) por medio del método de descarga de arco. Aunque con algunas variantes entre tipos de NTCs, el método esencialmente consiste en el paso de una corriente directa a través de dos electrodos de grafito de alta pureza en el interior de una atmósfera de Helio, con medidas de 300 nm de diámetro hasta unas pocas decenas de micrómetros con longitudes de 4 μm hasta 1 mm, lo cual origina un arco. Durante el proceso de formación de arco eléctrico, se forman depósitos sobre el cátodo, mientras que el ánodo se consume. Estos depósitos se cubren con una capa gris dura en la periferia. El centro, oscuro y blando, contiene nanotubos y partículas de grafito. Para que los NTCs se formen se requiere de un catalizador metálico por lo que la purificación es un paso adicional en el proceso; en su parte interna contienen una capa interna de cobre (Cu) o platino (Pt) como catalizador, y utilizan como combustible el peróxido de hidrógeno, que es descompuesto a H_2O y O_2 , produciendo con ello un sistema de propulsión de burbujas de O_2 . La concentración de H_2O_2 va de 2% hasta el 15%, utilizando como surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.5% para facilitar la eyección de las burbujas (Mei et al., 2011).

2.3.3 Pirólisis de hidrocarburos (deposición química de vapor)

La presencia de un catalizador metálico (Co, Ni, Fe, Pt, o Pd) depositado sobre sustratos como grafito o sílice, la pirólisis de hidrocarburos (como metano, benceno, acetileno, naftaleno o etileno) ofrece una alternativa para la producción de fullerenos, NTCs y otras nanoestructuras. A la pirólisis de hidrocarburos también se le conoce como deposición química en fase de vapor (CVD por sus siglas en inglés) y representa una alternativa para la producción masiva de NTCs; de hecho, la mayoría de los NTCs comerciales disponibles se sintetizan mediante este método (Narváez-Flórez et al., 2008).

Para poder apreciar la adición en los nanotubos de carbón, se tomó el ejemplo de la proteína de la clara de huevo (Ver Figura 6.).

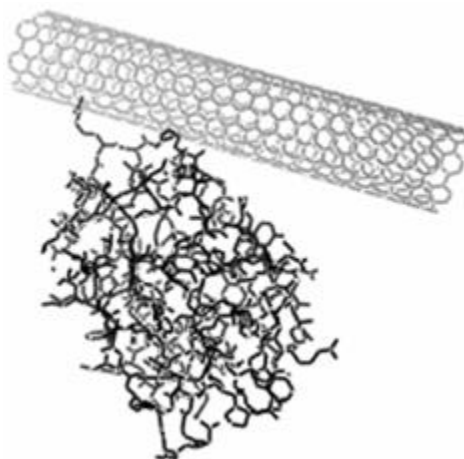


Figura 6. Complejo lisozima-NTC. El nanotubo se modeló con el programa TubeGen 3.3 (Frey y Doren, 2005). La estructura de la molécula de lisozima se obtuvo de la base de datos <http://www.pdb.org>, y el complejo se visualizó en el programa PyMOL v. 1.0 (DeLano Scientific, 2007).

2.4 Estado del arte

Las principales investigaciones realizadas en el tema se muestran en la Tabla 3. Esta información proporciona un panorama completo de la utilización de la *P. aeruginosa* en el proceso de eliminación de hidrocarburos.

Tabla 3. Aplicación de diversos microorganismos para remediación ambiental de derrames de hidrocarburos en cuerpos de agua.

| MICROORGANISMO | CONTAMINANTE | RENDIMIENTO |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | n-alcanos | n-alcanos con 11 y hasta 40 átomos de carbono (Pérez et al., 2003). |
| <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. fluorescens</i> | Petróleo, diésel 2, gasolina de 84 octanos y kerosene. | Logró remover 98% de plomo y 99% de cadmio en soluciones acuosas a pH 11 (Pompeo & Resasco, 2002). |
| <i>P. aeruginosa</i> | Naftaleno | El 100 % del naftaleno presente en fracción del crudo Casablanca a los 20 días incubación (Pucci et al., 2015). |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i> | Naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT | El fenantreno fue degradado por el 100% de las cepas estudiadas eliminaron los hidrocarburos naftaleno y antraceno (Romero et al., 2002). |

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Pseudomonas sp</i> y <i>Rhodococcus sp</i> | Petróleo crudo | La eliminación en C ₁₃ , C ₁₄ y C ₁₅ con porcentajes de eliminación, de 100%, 87% y 82% respectivamente (Ruíz-Martínez, 2007). |
| <i>Bacillus subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i> | Octano, dodecano, hexadecano, octadecano, pireno, fenantreno, antraceno | Aproximadamente 24%, 26% y 22% de TPH como carbono celular en <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , a 45 °C (Salgado et al., 2008). |
| <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> | Hidrocarburos complejos, fenoles, fenantreno y benzopirenos. | <i>P. aeruginosa</i> en el suelo de petróleo contaminado aislado de hasta 100% al final del proceso de incubación de 120 días Smart et al., 2006. |
| <i>P. aeruginosa</i> | Gasolina, diésel y kerosene) (antraceno, pireno y fenantreno). | <i>P. aeruginosa</i> cepa M y 30.0, 25.0 y 44.17% (Soler et al., 2013). |
| <i>Bacillus subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i> | Pireno | Pireno en cepas de <i>P. aeruginosa</i> M y NM con una eficiencia de 320 ± 06% a 96 h de crecimiento (Standar Specification, 2002). |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Bacillus</i> | Fenoles, ftalatos, benceno-xileno benceno-tolueno-acetato (BTEX). | Apoyan el crecimiento microbiano por la generación de energía de la oxidación de sustratos simples (Haleem et al., 2014). |
| <i>P. aeruginosa</i> | n-alcanos | n-alcanos con 11 y hasta 40 átomos de carbono (Pérez et al., 2003). |

3. JUSTIFICACIÓN

La PROFEPA y otras organizaciones han documentado emergencias ambientales relacionadas con los hidrocarburos las cuales no se remedian en su totalidad. La contaminación de agua dulce por las gasolinas afecta a todo el ecosistema e incluso puede llegar al hombre a través de la cadena alimenticia. Para poder resolver este problema ambiental, se propone el uso de la bacteria *P. aeruginosa* combinada con nanojets comerciales para realizar la remediación del agua dulce contaminada con gasolinas.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de la bacteria *P. aeruginosa* en combinación con nanojets comerciales podría llevar a cabo de manera eficiente, la eliminación de compuestos dañinos para los seres vivos como lo son: benceno, tolueno y xilenos (m, p y o) en agua dulce de un río contaminado por derrame de gasolina.

5. OBJETIVO GENERAL

Eliminación de benceno, tolueno y xilenos (m, p y o) de agua dulce del arroyo Hondo Veracruz, contaminada por gasolina Premium mediante el empleo de la bacteria *P. aeruginosa* combinada con nanojets comerciales.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

VI.1 Evaluar la eliminación de benceno, tolueno y xilenos en agua dulce contaminada, utilizando la bacteria *P. aeruginosa*.

VI.2 Evaluar la eliminación de benceno, tolueno y xilenos en agua dulce contaminada, utilizando nanojets comerciales combinados con la bacteria *P. aeruginosa*.

VI.3 Cuantificar la eliminación de benceno, tolueno y xilenos en agua dulce contaminada, utilizando nanojets comerciales combinados con la bacteria *P. aeruginosa*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Muestreo in situ

En el arroyo Hondo, en el municipio de Tierra Blanca del estado de Veracruz, que fue contaminado con gasolina Premium, se recolectaron 40 litros de agua contaminada para el estudio (Ver Figura 7 y 8).

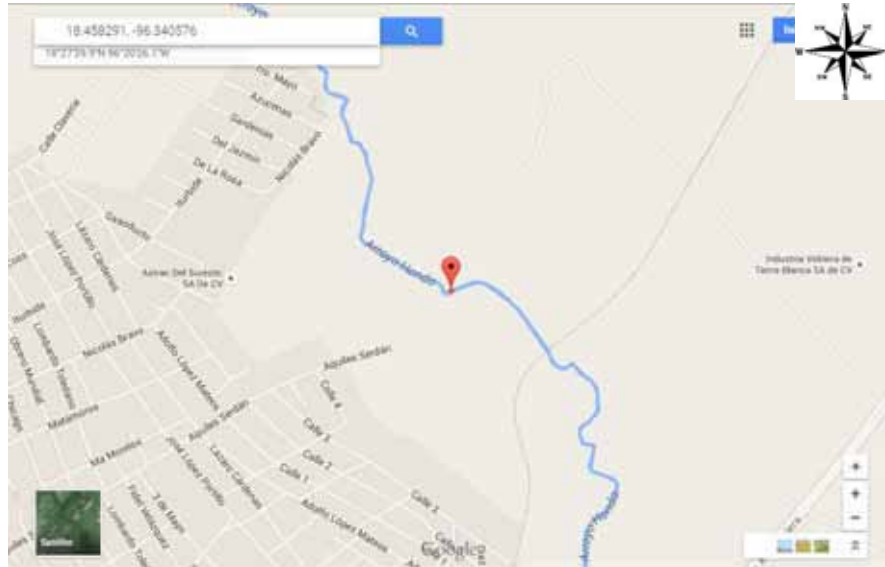


Figura 7. Localización del sitio de muestreo en el estado de Veracruz. 18°27'29.9"N, 96°20'26.1"E. Fuente: Google Maps.



Figura 8. Imagen del sitio de muestreo en el arroyo Hondo, Tierra Blanca, Veracruz.

7.2 Material Biológico

Se adquirió una cepa de *P. aeruginosa* en el mercado nacional. Un Vial Liofilizado (la presentación que maneja el Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica, (LIAT)) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Con ATCC: 15442 Lote: 57920428, cultivo CR 1er pase con fecha de caducidad: Octubre 2020. Con número de Certificado: C-006-15. Con 1×10^5 UFC.

Se adquirió el medio de cultivo Base Agar Cetrimida preparado en polvo fino de la empresa DIBICO con número de Lote: 11131124, con fecha de caducidad: 02 de marzo de 2018 (Ver Tabla 4) que consiste básicamente de los siguientes nutrientes:

Tabla 4. Contenido de Base Agar Cetrimida. Fuente: Hoja técnica del Agar base Cetrimida.

| Compuesto | Cantidad (g) |
|---------------------|--------------|
| Peptona de gelatina | 20 |
| Sulfato de Potasio | 10 |
| Cloruro de Magnesio | 1.4 |
| Cetrimida | 0.3 |
| Agar | 13.6 |

Para la confirmación de la *P. aeruginosa* se preparó el agar cetrimida. Se hidrató 45.3 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Se agregó 10 ml de glicerol. Se dejó reposar 10 a 15 min. Se calentó agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 min. para disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 min.

Se dejó enfriar aproximadamente a 45 °C. Se distribuyó en cajas de Petri estériles. Se conservó en refrigeración de 2 a 8 °C. El agar cetrimida es un medio selectivo para el aislamiento y el recuento de *P. aeruginosa*. Su formulación permite el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos (Ver Figura 9). La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*.



Figura 9. Cultivo preparado en caja de Petri.

Para la evaluación del crecimiento de la *P. aeruginosa* (Ver Figura 10) no se utilizó la determinación del peso de la biomasa por el sistema de transmisión de luz en un espectrofotómetro visible debido a que no es una prueba confiable ya que solo mide la turbiedad.



Figura 10. Crecimiento de *P. aeruginosa*.

Pruebas para confirmar el crecimiento de la *P. aeruginosa* (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Técnicas para la determinación del crecimiento e identificación de la *P. aeruginosa*

| | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Tinción de Gram | Bacilos Gram negativos |
| Oxidasa (figura 13) | Positiva |
| Pigmentación de fluorescencia (figura 11) | Amarillo limón al incidir luz ultravioleta |
| Pigmentación de piocianina* (figura 12) | Azul a verde metálico que se intensifica a las 48 h |
| Olor | A masa de tortilla |

*El pigmento de la piocianina es exclusivo de *P. aeruginosa*. Fuente: Manual de Bacteriología médica, ENCB-IPN.

Se siembra por inoculación directa. Se estrió con el asa bacteriológica en la placa de Petri de la colonia que estaba en el vial liofilizado y se incubó a 37°C.

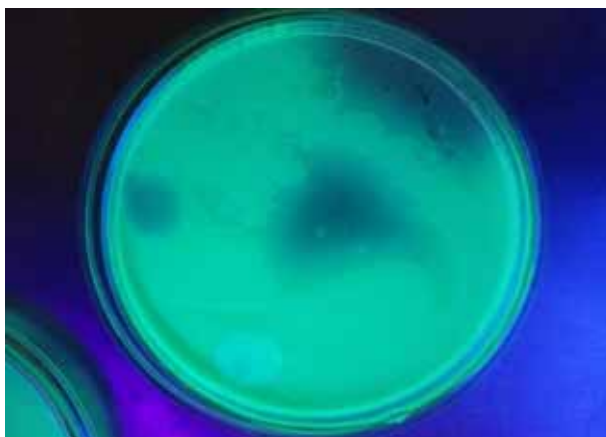


Figura 11. Luz UV para comprobación de la producción de la pigmentación



Figura 12. Vista a contraluz para observar la producción de la pigmentación



Figura 13. Vista en microscopio óptico para comprobar la tinción de Gram.

7.3 Experimentos de remediación en Biorreactores

Una vez confirmada la existencia de la cepa, se procedió a montar el sistema de biorreactores para evaluar la capacidad bioeliminadora de hidrocarburos por parte de la bacteria *P. aeruginosa* y la eficiencia de la aplicación de los nanojets. Para ello, se llevaron a cabo los experimentos en biorreactores, iniciando con un experimento sin bacterias ni nanojets o testigo (**TB-1, TB-2, TB-3, TB-4 y TB-5**), el segundo experimento se efectuó con el microorganismo sin nanojets (**B1, B2, B3, B4 y B5**) y el tercer experimento se efectuó con bacterias y con los nanojets (**BN2, BN3, BN4 y BN5**) conforme a la Tabla 6 muestreando a los 0, 7, 14, 21 y 28 días manteniendo los biorreactores en agitación horizontal a 180 rpm, 26 ± 2 °C durante 28 días (Ver Figuras 14 y 15). Además, se realizaron muestreos de crecimiento de la cepa en placas con medio agar de soya tripticaseína incubándose a 37°C por 24 h.



Figura 14. Montaje de sistema de biorreactores en el Shaker



Figura 15. Agitación de biorreactores en el Shaker

Tabla 6. Cantidades de gasolina y condiciones en los experimentos con los biorreactores

| Experimento | Vol. Agua de arroyo | Vol. Gasolina | Vol. emulsificante | Concentración de Células |
|-------------|---------------------|---------------|--------------------|--------------------------|
| TB-1 | 99 % | 0 | 1 % | 0 |
| TB-2 | 84 % | 15 % | 1 % | 0 |
| TB-3 | 74 % | 25 % | 1 % | 0 |
| TB-4 | 64 % | 35 % | 1 % | 0 |
| TB-5 | 54 % | 45 % | 1 % | 0 |
| B1 | 98 % | 0 | 1 % | $1 * 10^6$ |
| B2 | 83 % | 150 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| B3 | 73 % | 25 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| B4 | 63 % | 35 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| B5 | 53 % | 45 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| BN2* | 83 % | 15 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| BN3* | 73 % | 25 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| BN4* | 63 % | 35 % | 1 % | $1 * 10^6$ |
| BN5* | 53 % | 45 % | 1 % | $1 * 10^6$ |

- Nota: a los biorreactores 2 - 5 se le agregaron 1400 microgramos de nanojets.

7.4 Determinación del crecimiento bacteriano

Para la determinación de la población microbiana, se utilizó el método de recuento directo en la visualización de la placa de Petri porque es un método que divide en cuadrantes la placa de Petri y se cuentan el número de colonias formadas en cada cuadrante a simple vista (Ver Figura 16).



Figura 16. Placa con cuadrantes para conteo de colonias formadas

7.5 Análisis de la gasolina

Las muestras de gasolina en agua fueron tomadas con pipeta serológica de 10 ml y depositadas en recipientes de plástico previa esterilización en refrigeración a -2°C (Ver Figura 17 y 18). El aislamiento de las cepas se realizó por siembra en estrías sobre placas de agar de soya tripticaseína (TSA) (Ver Figura 19). El análisis de la muestra fue practicado en un Cromatógrafo Hewlett Packard 6890 con detector de ionización de flama (FID), Presiones del gas de Helio: 80 psi, Hidrógeno 40 psi y de aire: 80 psi. La temperatura de la columna fue de 70°C , y la del inyector de 160°C , con columna Capilar DB-WAX 30 m * 0.25 mm. Con un flujo de gases de aire: 240 ml/min, hidrógeno: 30 ml/min y helio: 20 ml/min y el volumen de inyección fue de 1 μL (Ver Figuras 20 y 21).

La eliminación de la gasolina por la cepa *P. aeruginosa* se estudió en un período de 28 días (672 h) dándose seguimiento cada 7 días (168 h) empleando como medio de cultivo el medio mineral descrito anteriormente.



Figura 17. Toma de muestras para el análisis cromatográfico



Figura 18. Toma de muestras para análisis cromatográfico



Figura 19. Toma de muestras para el cultivo bacteriano



Figura 20. Carrusel porta viales con muestras para análisis cromatográfico



Figura 21. Cromatógrafo HP 6890 con FID

Se identificaron los compuestos: benceno, tolueno, m, p y o-xileno, por ser éstos los más dañinos para la salud humana, se analizaron en primera instancia en grado reactivo para determinar su tiempo de retención, realizándose curvas de calibración para cuantificar estos productos y con ello llevar a cabo el análisis de las muestras con gasolina.

Para conocer la composición de la gasolina Premium, se obtuvo un cromatograma, el cual se muestra a continuación:

Con base a los tiempos de retención que se obtienen de los compuestos grado reactivo se identificó como primer compuesto el n-pentano a 3.98 min partiendo de lo anterior se determinaron los compuestos benceno con 6.98 min, tolueno 9.47 min, m, p y o xileno 12.61, 12.97 y 13.28 min respectivamente pertenecientes a la familia de los aromáticos debido a su toxicidad a los seres vivos (Ver anexo 1).

8.2 Curvas de calibración de los compuestos puros grado reactivo

Para determinar la concentración de algunos de los compuestos importantes en las diferentes muestras, se realizó una curva de calibración con soluciones de diferentes concentraciones en % volumen de los compuestos puros grado reactivo: benceno (Figura 23); tolueno (Figura 24); m-xileno (Figura 25); p-xileno (Figura 26) y o-xileno (Figura 27) Como se puede observar en las figuras (Figura 23 a 27) de las curvas de calibración todos los puntos se ajustaron a una línea recta con la cual se obtiene la ecuación de la recta la cual se utilizó para determinar la concentración de los compuestos que no se eliminaron.

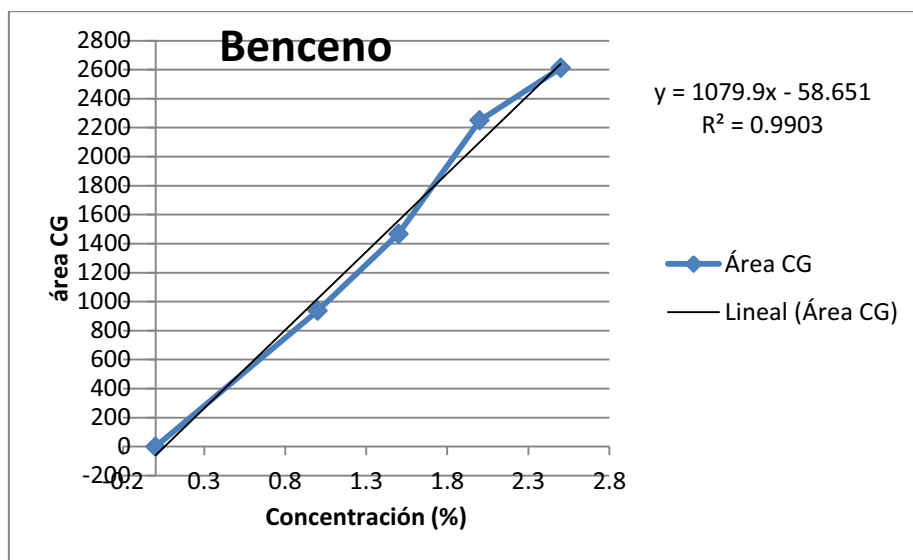


Figura 23. Curva de calibración del Benceno

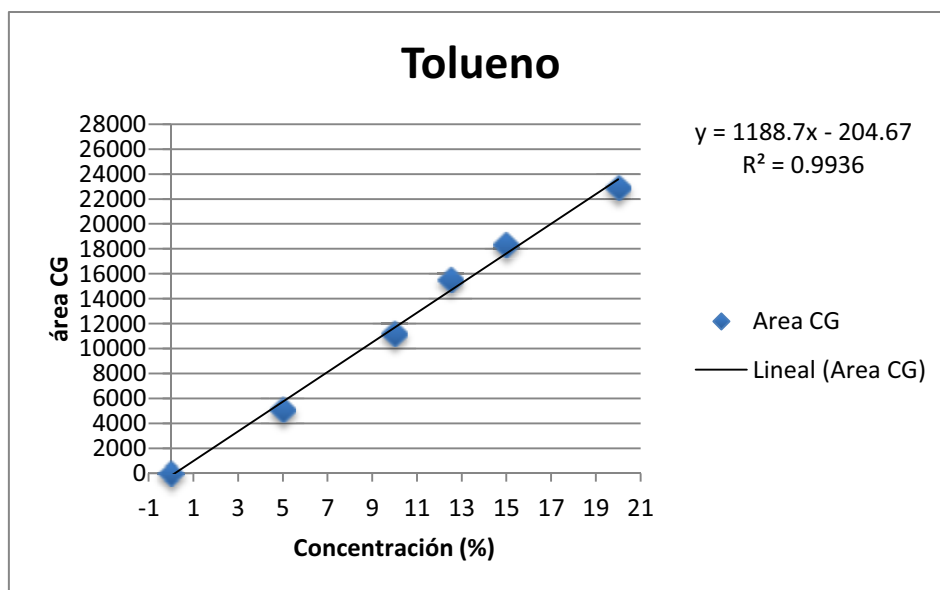


Figura 24. Curva de calibración del tolueno.

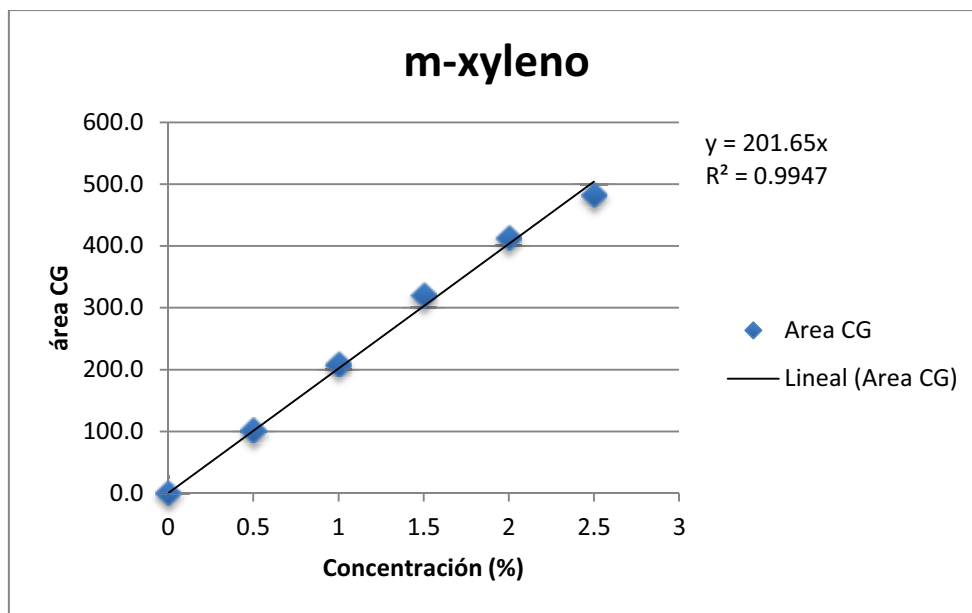


Figura 25. Curva de calibración del m-xileno.

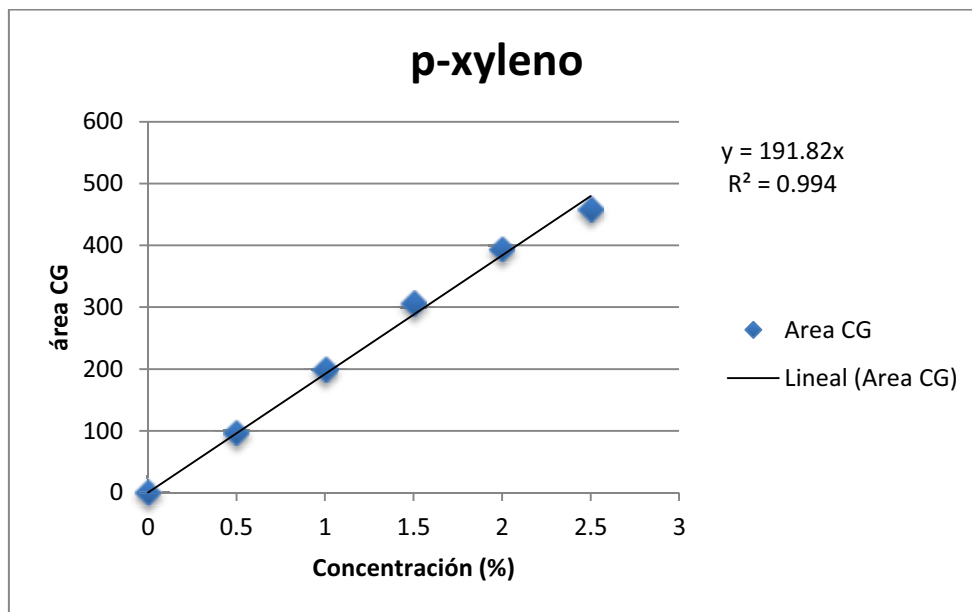


Figura 26. Curva de calibración del p-xileno.

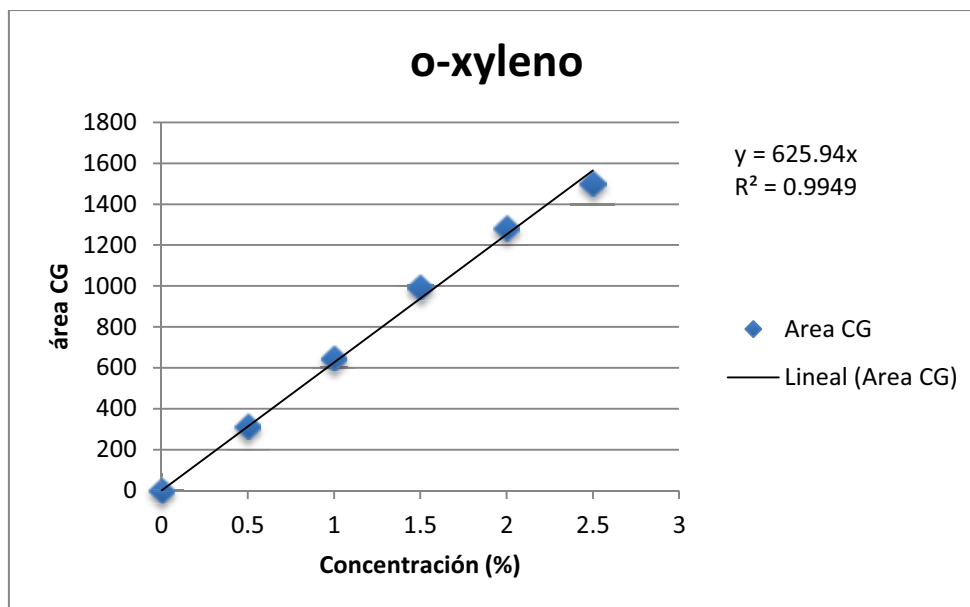


Figura 27. Curva de calibración del o-xileno.

8.3 Compuestos identificados en la muestra simple del agua del arroyo Hondo

Se analizó una muestra del agua del arroyo Hondo con las mismas condiciones en el mismo cromatógrafo de gases obteniendo el siguiente Cromatograma (Figura 28):

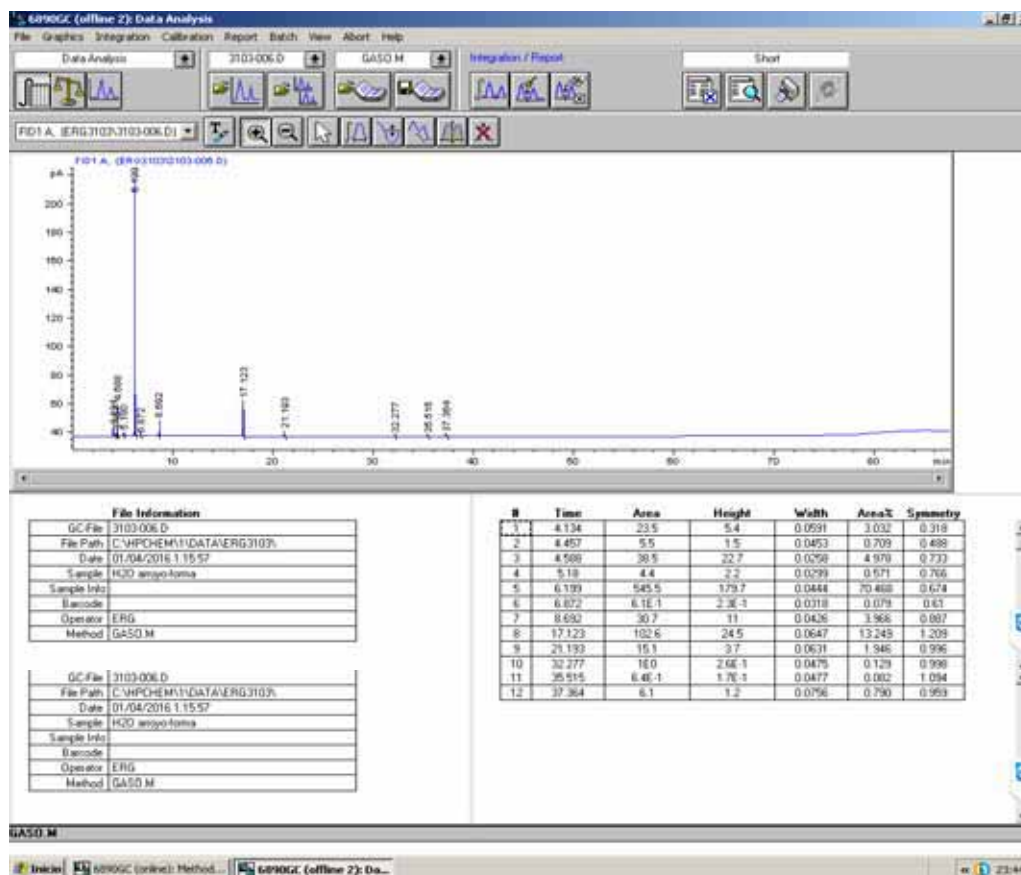


Figura 28. Cromatograma del análisis del agua del arroyo Hondo

El cromatograma de la muestra de agua simple del arroyo Hondo se identificaron los compuestos: benceno (6.87 min), n-heptano (4.45 min) confirmando que contiene compuestos tóxicos y la remediación ha sido parcial.

8.4 Resultados obtenidos en los experimentos de los biorreactores

En la Figura 29 se presentan los resultados obtenidos considerando solamente la concentración de benceno, su comportamiento en los experimentos testigo (TB), en los experimentos con suministro de bacterias (B) y por último en los experimentos con adición de bacterias y nanojets (BN). Para realizar la evaluación de los compuestos presentes en las muestras obtenidas en cada experimento realizado en los biorreactores, se tomó como base las curvas de calibración (tiempo de retención, unidad de área) de los compuestos puros grado reactivo. Los análisis se efectuaron en un cromatógrafo de gases.

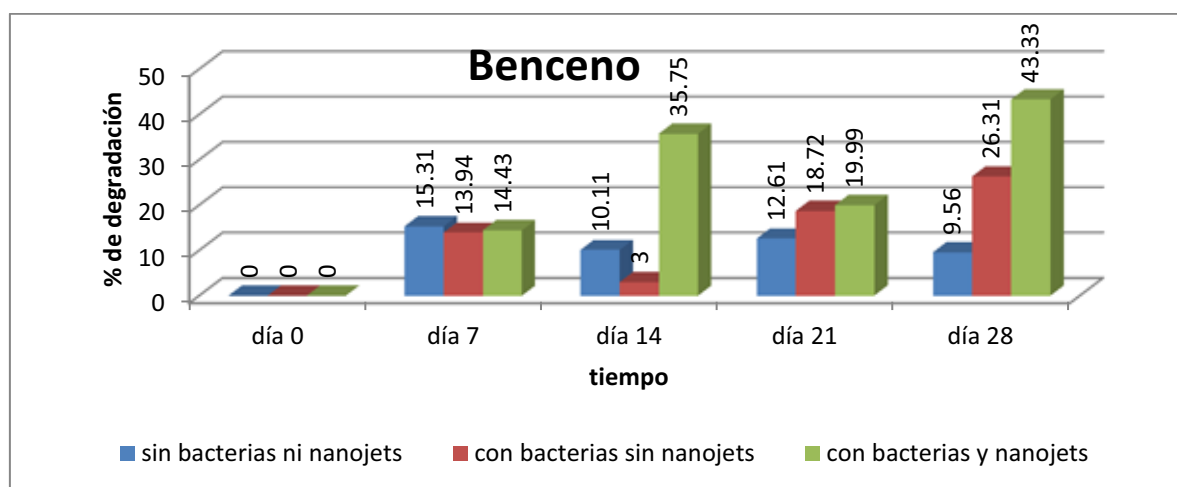


Figura 29. Eliminación de benceno en los 3 sistemas de experimentos.

Se analizó el benceno, ya que es un compuesto tóxico y cancerígeno para la salud humana y para los seres vivos, se observó que a partir del día 0 no tuvo porcentaje de eliminación. A los 7 días, los porcentajes de eliminación fueron superiores al 10%, sin embargo, la eliminación sin bacterias fue aún mayor, esta situación indicó que la *P. aeruginosa* adicionada estaba en proceso de adaptación y este porcentaje se vio levemente incrementado cuando se adicionaron los nanojets.

En el caso del día 14, el mayor porcentaje de eliminación (35%) correspondió al proceso con las bacterias y nanojets, lo que indicó que existió una influencia positiva al haber utilizado los nanojets en el proceso de eliminación, no obstante el menor porcentaje se obtuvo para el caso en el cual sólo se adicionaron las bacterias.

A los 21 días se obtuvo una mayor eliminación ($\approx 20\%$) cuando se adicionaron las bacterias y nanojets, con un comportamiento similar a las muestras con sólo bacterias, y se notó un decremento en el porcentaje de eliminación de la muestra testigo lo que indicó que las bacterias que se adicionaron predominan sobre los microorganismos nativos. Se mantuvo la misma tendencia a los 28 días con un mayor porcentaje de eliminación ($\approx 43\%$).

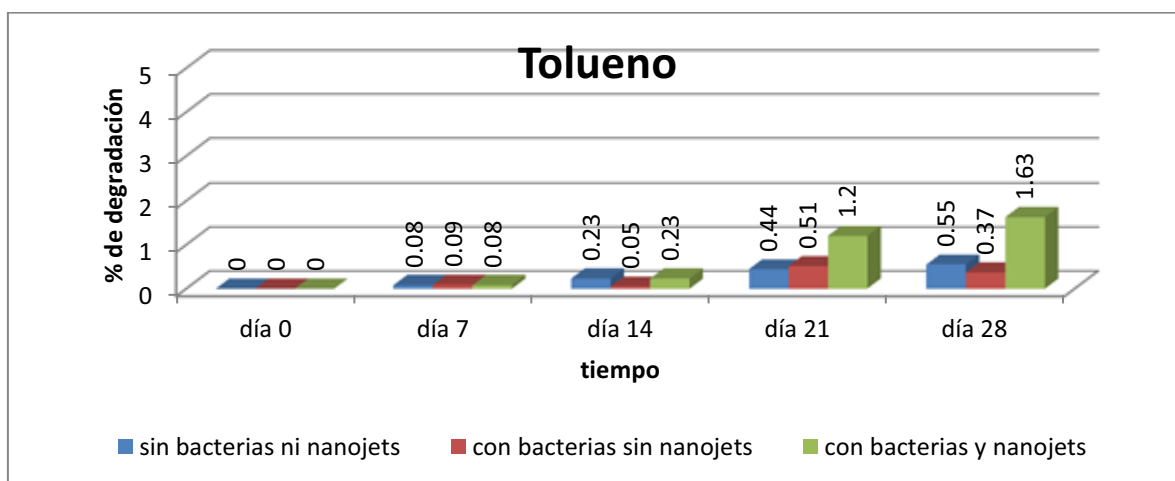


Figura 30. Eliminación de tolueno en los 3 sistemas de experimentos

Para el tolueno (Ver Figura 30), los porcentajes de eliminación al día 0 fueron nulos, existió un mismo comportamiento en todos los experimentos durante los primeros 7 días, a los 14 días el experimento en el cual solo se adicionaron las bacterias presentó un decremento en el porcentaje de eliminación probablemente porque es un periodo de adaptación en el cual existió competencia entre los microorganismos nativos y las bacterias adicionadas.

Es a partir del día 21 cuando se alcanzaron mayores porcentajes de eliminación. Y a los 28 días se alcanzó un valor máximo de eliminación del tolueno de 1.63% para el caso donde se realizó el tratamiento con bacterias y nanojets.

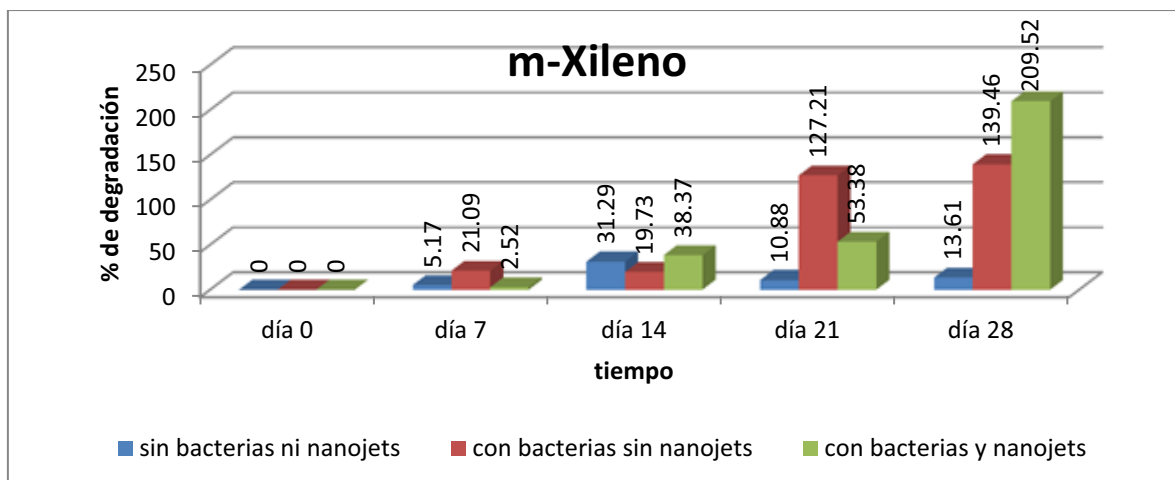


Figura 31. Eliminación de m-Xileno en los tres sistemas de experimentos

En el caso del m-xileno (Ver Figura 31) se observó que en el día 0 los porcentajes de eliminación fueron nulos. A los 7 días se apreció un mayor porcentaje de eliminación (21%) para cuando se emplearon las bacterias, sin embargo el uso de nanojets no fue representativo. A los 14 días, los porcentajes se incrementaron al 38% mostrando el mismo comportamiento que en los otros compuestos analizados.

En el día 21 se tuvieron porcentajes mayores debido a que hubo formación de xileno por la reacción de desproporción que sufrió el tolueno. A partir de los 28 días se tuvieron porcentajes aún mayores debido a que hubo formación de xileno por la reacción de desproporción que sufrió el tolueno. Existiendo una diferencia considerable en los diversos porcentajes de eliminación en los experimentos del testigo y el experimento de bacterias y nanojets.

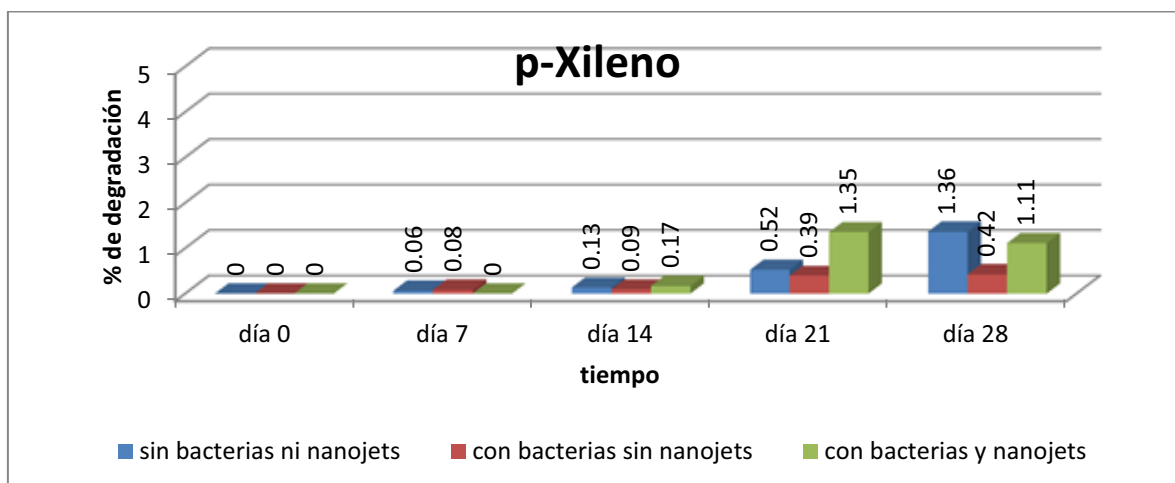


Figura 32. Eliminación de p-Xileno en los 3 sistemas de experimentos.

En el día 0 de la experimentación la cantidad eliminada de p-xileno (Ver Figura 32) fue nula. A los 7 días se vio que hubo una mayor eliminación del compuesto por parte de las bacterias, la experimentación con bacterias y nanojets demostraron no tener ninguna influencia en la eliminación de este compuesto. Siendo los valores obtenidos menores al 1%.

El comportamiento a los 14 días fue el mismo que con los otros compuestos, obteniéndose el menor porcentaje de eliminación cuando se trató la muestra solamente con las bacterias. Sin embargo, a los 21 días se tuvieron porcentajes mayores de eliminación del p-xileno, aunque fue importante notar que los menores valores de eliminación correspondieron al sistema de experimentación en el que sólo se adicionaron bacterias, misma situación se presentó a los 28 días. La eliminación más efectiva fue la realizada a partir de la experimentación con bacterias y nanojets.

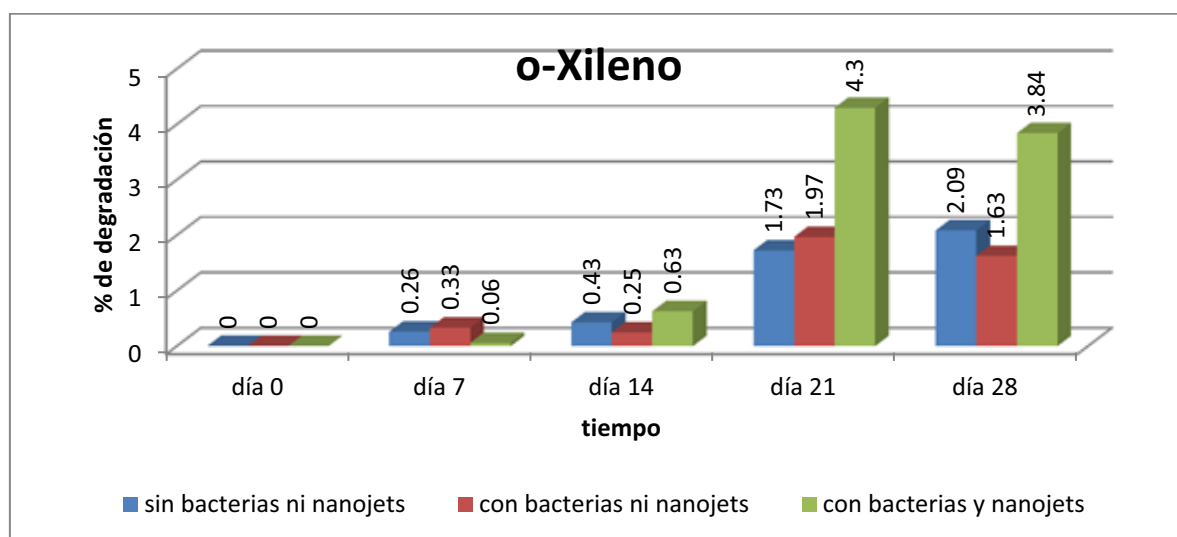


Figura 33. Eliminación de o-Xileno en los 3 sistemas de experimentos.

En el caso de la eliminación del o-xileno al día 0 se tuvieron valores nulos de eliminación. (Ver Figura 33). A los 7 días hay un cambio en el comportamiento y fueron las bacterias las que tienen un mayor porcentaje de eliminación. A los 14 días el comportamiento se invirtió y fue mayor la cantidad eliminada por los microorganismos nativos y por la combinación de las bacterias con nanojets.

A los 21 días el porcentaje de eliminación producida por los microorganismos nativos y por las bacterias casi fue el mismo y fue la combinación de las bacterias y nanojets los que

proporcionan un mayor porcentaje de eliminación (4.3%). Este comportamiento se mantuvo a los 28 días, aunque se alcanzó una menor eliminación (3.84%). El análisis de eliminación se llevó a cabo para 28 días, pero a partir de la información obtenida se establece que era necesario haber realizado la evaluación de eliminación a mayor tiempo, para alcanzar una mayor certeza en la experimentación.

9. DISCUSIÓN

La *P. aeruginosa* es una de las bacterias de mayor resistencia a ambientes agresivos, con una capacidad metabólica para mineralizar gran variedad de hidrocarburos del petróleo como n-alcenos, hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos. Tiene la capacidad de sintetizar ramnolípidos (quiénes promocionan la interacción entre el sustrato y la membrana celular de la *P. aeruginosa*, emulsionando el sustrato y permitiendo su absorción) cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento, contribuyendo así con la movilización y solubilización de los contaminantes (Tasis et al., 2006).

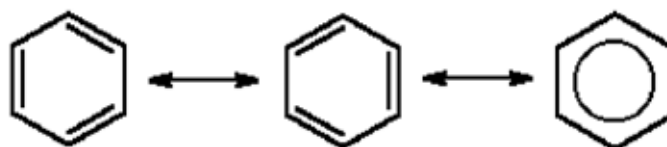
En el cromatograma del agua contaminada del arroyo Hondo se identificaron compuestos como: benceno, n-hexano, n-heptano, ciclohexano, entre otros. Se asegura su eliminación por la *P. aeruginosa* por ser un microorganismo productor de biosurfactantes extracelulares que solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica; conteniendo además enzimas eliminadoras de hidrocarburos en la membrana citoplásmica (Thomassin-Lacroix, 2002).

El benceno es el compuesto que obtuvo los más altos porcentajes de eliminación, los resultados muestran que en los días 14 y 28 para el experimento con bacterias y nanojets se obtienen los porcentajes más altos en eliminación (35.7% y 43.3% respectivamente), mientras que en el día 14 fue el de menor eliminación con un 3% para el experimento con bacterias sin nanojets. Estos compuestos actúan ellos mismos como aceptores de electrones terminales, apoyan el crecimiento microbiano por la generación de energía de la oxidación de sustratos simples. Reacciones como decoloración, hidrólisis, reducción nitro y desalquilación se producen durante la degradación anaeróbica de los plaguicidas (Haleem et al., 2014).

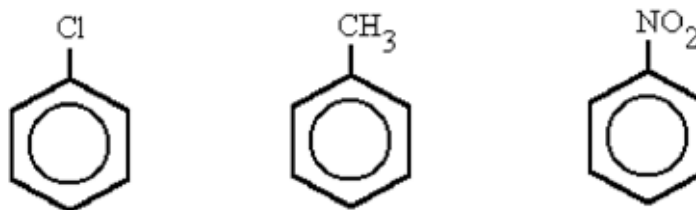
Los resultados para el tolueno muestran menos del 1% de eliminación en los días 7, 14 y para los días 21 y 28 rebasa el 1% para el experimento con bacterias y nanojets, siendo los porcentajes más altos debido a que el tolueno es un compuesto que se degrada con mayor facilidad y reacciona formando benceno y xilenos por el proceso de desproporción y benceno y metano por hidrodealquilación. Como lo reportó (Das et al., 2006) estas cepas al ser una mezcla compleja de lipoproteínas y glicolípidos con lípidos, hidratos de carbono y contenidos de proteína de 31.25, 41.0 y 25.75%, respectivamente, para *P. aeruginosa* cepa M y 30.0, 25.0 y 44.17%,

Los resultados para el m-xileno muestran que en el día 7 se tiene la eliminación más baja con 2.5%, mientras que para el día 14, la eliminación es mayor al 19%, para los días 21 y 28 se obtiene una mayor cantidad (>100%) debido a su formación a partir del tolueno, las condiciones experimentales en donde se obtiene un mayor porcentaje de eliminación de este compuesto es cuando se adicionaron las bacterias junto con los nanojets.

El desproporcionamiento del tolueno implica una transferencia de grupos metilo con formación de benceno y xilenos:

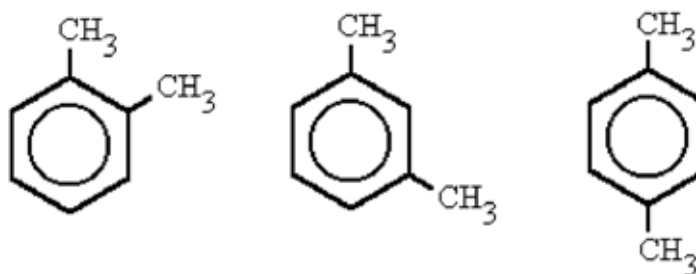


Cuando el benceno lleva un radical se nombra primero dicho radical seguido de la palabra "**benceno**".



clorobenceno, metilbenceno (tolueno) y nitrobenceno

Si son dos los radicales se indica su posición relativa dentro del anillo bencénico mediante los números 1,2; 1,3 ó 1,4, teniendo el número 1 el sustituyente más importante. Sin embargo, en estos casos se sigue utilizando los prefijos "**orto**", "**meta**" y "**para**" para indicar esas mismas posiciones del segundo sustituyente.



| | |
|----------------------------------------|------------|
| 1,2-dimetilbenceno, (o-dimetilbenceno) | (o-xileno) |
| 1,3-dimetilbenceno, (m-dimetilbenceno) | (m-xileno) |
| 1,4-dimetilbenceno, (p-dimetilbenceno) | (p-xileno) |

lo que significa una disminución del tolueno y un aumento en la cantidad de m-xileno. Teniéndose la formación de m-xileno a partir del proceso de transformación del tolueno para el caso de la muestra tratada con bacterias (Abalos et al., 2004).

Los resultados para el p-xileno muestran que para los días 7, 14 se logra una eliminación menor al 1% y para el día 21 y 28 rebasan el 1%, coincidiendo con los resultados del m-xileno se obtienen las mejores condiciones de eliminación para el experimento con bacterias y nanojets. Para el caso de (Das & Mukherjee, 2005) se encontró aproximadamente 24%, 26% y 22% de TPH como carbono celular en *B. subtilis*, *P. aeruginosa* cepas M y NM, a 45 °C respectivamente. El nivel de contaminación TPH se detectó como 20.0% de fracción aromática (20,0%)

Para o-xileno se muestra la misma tendencia en cuanto a las cantidades eliminadas para los primeros días de la experimentación, a su vez para los días 14, 21 y 28 el porcentaje de eliminación alcanzado es de aproximadamente 4% superior a los obtenidos para m-xileno y p-xileno debido a las condiciones de experimentación con adición conjunta de bacterias y nanojets. Para el caso de (Narváez-Flórez et al., 2008). En un período de incubación de los ensayos de eliminación de alifáticos en términos mono aromáticos y poliaromáticos donde el cultivo bacteriano degradó el 68.61%.

Hay una eliminación de estos compuestos aromáticos dentro de la gasolina a partir de los primeros quince días de tratamiento, aunque existe un decremento en la capacidad de eliminación en todos casos a los 14 días, especialmente para el caso de los experimentos donde sólo se añadió bacterias, comportamiento que puede deberse a que hay una competencia entre los microorganismos nativos (bacterias, hongos, algas, etc.) y las bacterias añadidas. Después de este periodo de tiempo es clara la influencia de las bacterias en el proceso de eliminación, aumentando éste con el uso de nanojets.

Los experimentos demuestran que la adición de nanojets eficientiza la eliminación de benceno en los días 14, 21 y 28; para el tolueno en los día 21 y 28; para el m-xileno en los días 14 y 28; para el p-xileno en los días 14 y 21; y para el o-xileno en los días 14, 21 y 28.

10. CONCLUSIONES

La cepa utilizada de *P. aeruginosa* fue capaz de crecer sobre gasolina como única fuente de carbono llevando a cabo su bioeliminación.

La gasolina Premium, está conformada por una gran variedad de compuestos, sin embargo la familia de aromáticos tiene especial importancia por su toxicidad, por lo que en esta investigación se les dió prioridad en cuanto a su determinación en las muestras obtenidas. Motivo por el cual se consideró como representativo establecer el porcentaje de eliminación en función de estos compuestos. No obstante, sabemos que existen compuestos que pertenecen a las otras familias que también se degradan.

Se obtuvo un alto porcentaje en la eliminación de benceno, reduciendo considerablemente su presencia al final del proceso de eliminación.

En cuanto al tolueno, este compuesto alcanzó un porcentaje final menor al 1% debido a que una parte de él se elimina y la otra parte reacciona para formar, benceno y xileno, así como benceno y metano, lo que originó un aumento significativo en la cantidad de m-xileno durante el tratamiento y su permanencia en los resultados finales, siendo necesario un mayor tiempo de tratamiento para reducir su concentración.

La producción de m-xileno se ve reflejada como un aumento en la concentración obtenida en el proceso de eliminación a partir del día 14, haciendo más difícil su eliminación a corto plazo. Siendo necesario un tiempo de tratamiento mayor a los 120 días. En el caso del p-xileno y o-xileno la cantidad degradada no es tan significativa porque se obtuvieron porcentajes menores al 4% porque el m-xileno se encuentra en mayor proporción (hasta un 60 a 70 %) y el p-xileno en menor proporción (hasta un 5 %).

La adición de nanojets eficientiza la eliminación de la gasolina a partir de los 28 días de tratamiento, éstos precursores ayudan a la bacteria durante dicha eliminación porque permiten mejores condiciones para el crecimiento de las bacterias. Lo que se ve reflejado como un aumento en la eliminación.

11. PROSPECTIVAS

Se recomienda ampliar el tiempo de análisis para obtener una mejor eliminación de los compuestos contaminantes a partir de 120 días, ya que se pudo apreciar el crecimiento continuo de la bacteria aún después de la toma de muestras y por los resultados obtenidos y los reportados en la literatura la eliminación será mayor.

Se recomienda utilizar petróleo crudo para probar su eliminación por la bacteria *P. aeruginosa* combinada con los nanojets comerciales.

12. REFERENCIAS

1. Abalos, A., Viñas, M., Sabate, J., Manresa, M. A. y Solanas, A. M. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15. Barcelona, España. 249–260.
2. Baughman, R., Zakhidov, A., de Heer, W. (2002). Carbon Nanotubes-the Route toward Applications. *Science* 297. 787-792.
3. Bianco, A., Prato, M. (2006). Can Carbon Nanotubes Be Considered Useful Tools for Biological?.
4. Borrás, C. G. (2012). Mareas negras. Centro Tecnológico del Mar. Bouzas-Vigo, España.
5. Bouza, E., García-Garrote, F., Cercenado, E., Marín, M., Díaz, M.S. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43. 981-2.
6. Bracho, M., Díaz, L. y Soto, L. M. (2004). Eliminación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela.
7. Chugani, S. A., M. Whiteley, K. M., Lee, D., Argenio, C., Manoil, and P. Greenberg. (2001). QscR, a modulator of quorum sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98.2752-2757.
8. Collins, P., Avouris, P. (2000). Nanotubes for Electronics. *Scient. Am.* 283. 62-69.
9. Das, K. & Mukherjee, A. K. (2005). Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. *Applied Microbial Biotechnology*. 69: 192–199. India.
10. Das, K. & Mukherjee, A. K. (2006). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*. India.
11. Das, K. & Mukherjee, A. K. (2006). Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 1364-5072. Assam, India.
12. Dasgupta, N., Arora S. K. & Ramphal, R. (2000). Fln, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182. 357-364.
13. DeLano Scientific. (2007). PyMOL ver. 1.0. DeLano Scientific. San Francisco, CA, EEUU.

14. Demaneche S, Kay E, Gourbiere F, Simonet P. (2001). Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (6). 2617-2621.
15. Dieckmann, G., Dalton, A., Johnson, P., Razal, J., Chen, J., Giordano, G., Muñoz, E., Musselman, I., Baughman, R., Draper, R. (2003). Controlled Assembly of Carbon Nanotubes by Designed Amphiphilic Peptide Helices. *J. Am. Chem. Soc.* 125. 1770-1777.
16. Echeverri, J. G. E., Manjarrez, P. G. & Cabrera, O. M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. ISSN: 1794-2470 V8. 13. Colombia.
17. Erdoğan, E., Şahin, F. & Namlı, A. (2013). Phospholipid fatty acids analysis-fatty acid methylester (PLFA-FAME) changes during bioremediation of crude oil contamination soil. *African Journal of Soil Science*. 1 (1). October. Estambul, Turquía. 001-008.
18. Erdoğan, E., Şahin, F. & Karaca, A. (2011). Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 11(21). 13 March. Estambul, Turquía. 4853-4859.
19. Fan C, Qing X, Kwang J. (2003). Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H Fluorescence. *Applied And Enviromental Microbiology*. 69 (11). 6715-6722.
20. Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. G., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana Microbiología*. 48. (2). Abril - Junio. 179 – 187.
21. Frey, J.T., Doren, D.J. (2005). TubeGen 3.3. University of Delaware. Newark, DE, EEUU. Recuperado en <http://turin.nss.udel.edu/research/tubegenonline.html>.
22. Galván L., Reyes R., Guédez, C. (2007). Los macroprocesos de la industria petrolera y sus consecuencias ambientales. *Universidad, Ciencia y Tecnología (UCT)*. 11(43). 91-97.
23. Giraldo, J.D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2014). Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB-25. *Revista Sociedad Química de Perú*. 80 (1). Perú.
24. Haleem, K. A. A., Sadguna, A., Divya, V., Begum, S. & Siddiqui, A. S. (2014). Potential of Microorganisms in Clean-up the Environment. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, ISSN: 2321-3124. India.

25. Harris, A.D., Perencevich, E., Roghmann, M.C., Morris, G., Kaye, K., Johnson, J. (2002). Risk, factors for Piperacilin-Tazobactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalizes patients. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 46. 854-8.
26. Leadbetter, E. D. (2002). Prokaryotic diversity: form, ecophysiology and habitat. En: Hurst C. J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney M.J., Stetzenbach, L.D. *Manual of Environmental Microbiology* 2nd. Edition. Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., 19 – 31.
27. Lin, Y., Taylor, S., Li, H., Fernando, K., Qu, L., Wang, W., Gu, L., Zhou, B., Sun, Y. (2004). Advances toward Bioapplications of Carbon Nanotubes. *J. Mat. Chem.* 14.527-541.
28. Lopolito, M. F., Molina, T. L. B., Corbella, M. E., Kabbas, S., García, E., Lanfranchi, D., C. E. y Gómez, H. L. E. (2011). *Bioeliminación de hidrocarburos del petróleo y compuestos relacionados*. Instituto nacional de ciencias y técnicas hídricas. Argentina.
29. Loya del Ángel, D. I. (2013). *Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos*. Tesina de Especialista en Gestión e Impacto Ambiental. Universidad Veracruzana Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz.
30. Mei, Y., Alexander, S. A., Sanchez, S., & Schmidt, O. G. (2011). Rolled-up nanotechnopolymers: from basic perception to self-propelled. 40. 2109–2119.
31. Narváez-Flórez, S., Gómez, L. M., y Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. 37 (1). Santa Martha, Colombia.
32. Osuna, A. J. M., Marroquín, J. J. A. y García, S. E. J. (2010). *Ecología y Medio Ambiente*. Editorial Progreso.
33. Pérez, S. R. M., Abad, P.G., Abalos, R. A., Marañón, R. A. y Bermúdez, S. R. C. (2003). Bioeliminación de naftaleno por *Pseudomonas aeruginosa* AT18. *Tecnología Química*, Vol. XXIII, No. 3. Cuba.
34. Pompeo, F., Resasco, D. (2002). Water Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes by Functionalization with Glucosamine. *Nano Lett.* 2. 369-373.
35. Pucci, G., Acuña A. & Pucci, O. (2015). Bioeliminación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. *Revista peruana de biología*. 22(1). 097 – 0101. Perú.
36. Romero, J., Luengo, C., Huber, J., Rosolen, J. (2002). Synthesis of Single-Wall Nanotubes by Pyrolysis of Graphite in Helium Atmosphere. *Química Nova*. 25. 59-61.

37. Ruíz-Martínez L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 32-54.
38. Salgado, B.R., Pineda, F. G., Mesta, H.A.M. y Díaz, C.F. (2008). Eliminación de n-alcanos por *Pseudomonas. aeruginosa* MGP-1. *Revista Ciencia y Tecnología*. Año 7. Número 7.
39. Smart, S., Cassady, A., Lu, G., & Martin, D. (2006). The Biocompatibility of Carbon Nanotubes. *Carbon* 44. 1034-1047.
40. Soler, L., Magdanz, V., Fomin, V. M., Sanchez, S., & Schmidt, O. G. (2013). Self-Propelled Micromotors for Cleaning Polluted Water. 7(11). 9611–9620.
41. Standar Specification for Automotive Gasoline. (2002). ASTM D-439-86 y D4814 -93 Fuel Trends. Lubrizol, Cleveland, Ohio.
42. Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., & Prato, M. (2006). Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chem. Rev.* 106.1105–1136.
43. Thomassin-Lacroix, E., Eriksson, M., Reimer, K., Mohn, W. (2002). Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology Biotechnology*. Quebec. 59. 551-556. Canadá.
44. Volke, S. T., & Velasco, T. J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. INE-SEMARNAT. México D.F.
45. Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Environmental biotechnology*. 12. 237–241.
46. Yang, W., Thordarson, P., Gooding, J. J., Ringer, S. P., Braet, F. (2007). Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*. 18. 412001-412012.

13. ANEXOS

Anexo 1. Compuestos identificados en la gasolina Premium por familia PIANO

Tabla 7. Compuestos identificados en la gasolina Premium con respecto a la familia (PIANO)

| Compuesto | FAMILIA |
|---------------------------------|--------------|
| 3-Methyl-1-butene | OLEFINAS |
| Isopentane | ISOPARAFINAS |
| 1-Pentene | OLEFINAS |
| 2-Methyl-1-Butene | OLEFINAS |
| n-pentane | PARAFINAS |
| trans-2-pentene | OLEFINAS |
| cis-2-pentene | OLEFINAS |
| 4-methyl pentene-1 | OLEFINAS |
| Cyclopentane | NAFTENOS |
| MTBE | MTBE |
| 2-methylpentane | ISOPARAFINAS |
| 3-methylpentane | ISOPARAFINAS |
| 1-hexene | OLEFINAS |
| n-hexane | PARAFINAS |
| trans-2-hexene | OLEFINAS |
| 2-methylpentene-2 | OLEFINAS |
| Cis-2-hexene | OLEFINAS |
| 2,2 dimethylpentane | ISOPARAFINAS |
| methylcyclopentane | NAFTENOS |
| 2,4-dimethylpentane | ISOPARAFINAS |
| 2,2,3 trimethylbutane | ISOPARAFINAS |
| Benzene | AROMÁTICOS |
| 3,3dimethylpentane | ISOPARAFINAS |
| Cyclohexane | NAFTENOS |
| 2-methylhexane | ISOPARAFINAS |
| 2,3dimethylpentane | ISOPARAFINAS |
| 1,1-Dimethylcyclopentane | NAFTENOS |
| ETBE | ETBE |
| 3-methylhexane | ISOPARAFINAS |
| Cis-1,3-dimethylcyclopentane | NAFTENOS |
| trans, 1,3-dimethylcyclopentane | NAFTENOS |
| 3-ethylpentane | ISOPARAFINAS |
| trans-1,2-dimethylcyclopentane | NAFTENOS |

| | |
|---------------------------------|--------------|
| 1-heptene | OLEFINAS |
| Trans-3-heptene | OLEFINAS |
| n-heptane | PARAFINAS |
| TRANS-2-HEPTANE | OLEFINAS |
| CIS-2-HEPTENE | OLEFINAS |
| METHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| 2,2-DIMETHYLHEXANE | ISOPARAFINAS |
| 2,5-DIMETHYLHEXANE | ISOPARAFINAS |
| ETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| 2,2,3-TRIMETHYLPENTANE | ISOPARAFINAS |
| 2,4-DIMETHYLHEXANE | ISOPARAFINAS |
| CTC-1,2,4-TRIMETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| CTC-1,2,3-TRIMETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| TOLUENE | AROMÁTICOS |
| 2,3-DIMETHYLHEXANE | ISOPARAFINAS |
| 2-methylheptane | ISOPARAFINAS |
| 4 METHYLHEPTANE | ISOPARAFINAS |
| CTT-1,2,4 TRIMETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| 3METHYLHEPTANE | ISOPARAFINAS |
| TRANS-1,4-DIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| TRANS-1,2-DIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| N-Octane | PARAFINAS |
| TRANS-2-OCTENE | OLEFINAS |
| ISOPROPYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| CIS-2-OCTENE | OLEFINAS |
| CIS-1,2-DIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| N-PROPYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| CCC-1,3,5-TRIMETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| 1,1,4-TRIMETHYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| 2,5-DIMETHYLHEPTANE | ISOPARAFINAS |
| 3,3-DIMETHYLHEPTANE | ISOPARAFINAS |
| 3,5-DIMETHYLHEPTANE (L) | ISOPARAFINAS |
| ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| CTT-1,2,4 TRIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| M-XYLENE | AROMÁTICOS |
| P-XYLENE | AROMÁTICOS |
| 2-METHYLOCTANE | ISOPARAFINAS |
| CCC-1,2,4-TRIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| 1,1,2-TRIMETHYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| N-Nonane | PARAFINAS |
| ISOPROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |

| | |
|-----------------------------|--------------|
| CIS-2-NONENE | OLEFINAS |
| ISOPROPYLCYCLOHEXANE | NAFTENOS |
| 2,2-DIMETHYLOCTANE | ISOPARAFINAS |
| N-BUTYLCYCLOPENTANE | NAFTENOS |
| N-PROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-3-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-4-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 3-ETHYLOCTANE | ISOPARAFINAS |
| 3-METHYLNONANE | ISOPARAFINAS |
| 1,2,4-TRIMETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| TERT-BUTYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| ISOBUTYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| SEC-BUTYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| N-Decane | PARAFINAS |
| 1-METHYL-3-ISOPROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-4-ISOPROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-3-N-PROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-4-N-PROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| N-BUTYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,3-DIMETHYL-5-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,2-DIETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1-METHYL-2-N-PROPYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,4-DIMETHYL-2-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,2-DIMETHYL-4-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,2-DIMETHYL-3-ETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| N-Undecane | PARAFINAS |
| 1,2,4,5-TETRAMETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| 1,3,5-TRIETHYLBENZENE | AROMÁTICOS |
| N-Dodecane | PARAFINAS |
| N-Tridecane | PARAFINAS |
| N-Tetradecane | PARAFINAS |

Tabla 8. Resultados de porcentaje de los compuestos de la gasolina Premium por familias

| RESULTADOS | |
|------------|--------------|
| % wt | Familias |
| 8.2 | PARAFINAS |
| 25.3 | ISOPARAFINAS |
| 24.9 | AROMATICOS |
| 6.2 | NAFTENOS |
| 11.6 | OLEFINAS |
| 23.8 | DESCONOCIDO |

Anexo 2. Ejemplos de compuestos pertenecientes a las familias PIANO

Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno constituyen las parafinas

| PARAFINAS NORMALES | | | | | % EN PESO H ₂ | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | ∞ |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--|----|----|------|------|------|------|
| | | | | | | | 25 | 30 | 18.2 | 17.3 | 16.7 | 14.3 |
| $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ | | | | | | | | |
| METANO | ETANO | PROPANO | BUTANO | PENTANO | | | | | | | | |

Figura 34. Parafinas.

Cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas

| ISOPARAFINAS { | | | | % EN PESO H2 : IDEM | No. DE ISOMEROS | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 ... | C12 ... | C15 ... | C18 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|----|----|----|----|----|--------|---------|---------|-------|
| | | | | | | 2 | 3 | 5 | 9 | 18 | 35 | 355 | 4347 | 60523 |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | | | | | | | | | | | |
| ISOBUTANO | ISOPENTANO | NEOPENTANO | ISO OCTANO | | | | | | | | | | | |

Figura 35. Isoparafinas.

Al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas

| OLEFINAS | | | | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | | | | | | | | | | | | |
| $\begin{array}{c} 14.3\% \text{ H}_2 \\ \text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} 14.3\% \text{ H}_2 \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} 14.3\% \text{ H}_2 \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$ | $\begin{array}{c} 14.3\% \text{ H}_2 \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} 11.1\% \text{ H}_2 \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})=\text{CH}_2 \end{array}$ | | | | | | | | |
| ETILENO | PROPILENO | BUTILENO | ISOAMILENO | 1,3 BUTADIENO | | | | | | | | |

Figura 36. Olefinas.

Las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos

| NAFTENOS | | | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | | % EN PESO H ₂ | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| | | | | | | | | | | | |
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{C} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ | | | | | | | | |
| CICLOHEXANO | 1,1 DIMETILCICLOPENTANO | 1,2,3 TRIMETIL CICLOHEXANO | DECAHIDRONAFTALENO (DECALINA) | | | | | | | | |

Figura 37. Naftenos.

Cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos.

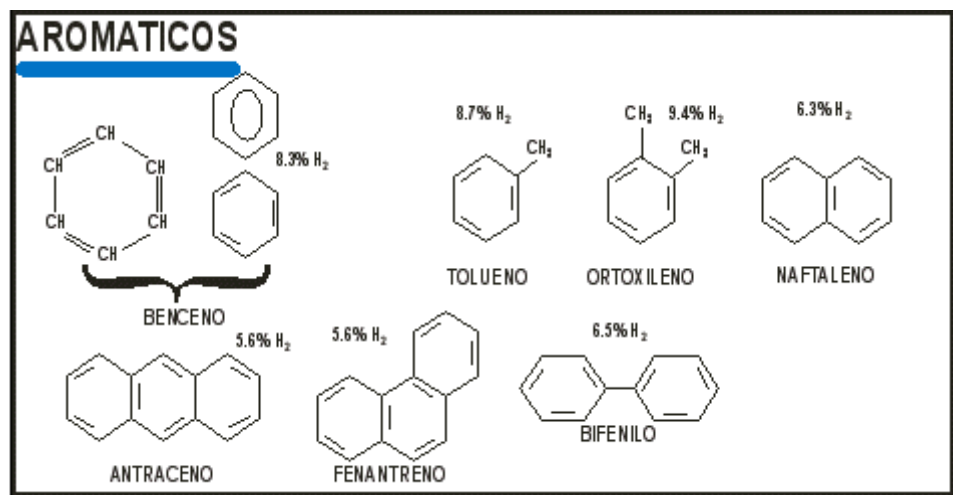


Figura 38. Aromáticos.

Anexo 3. Curvas de calibración de compuestos puros

Tabla 9. Valores promedios del benceno para la curva de calibración

| Benceno | | |
|-------------------|---------|------------------|
| Concentración (%) | Área CG | Tiempo retención |
| 1 | 938.9 | 6.985 |
| 1 | 948.8 | 6.985 |
| 1 | 921.8 | 6.984 |
| 1.5 | 1410.1 | 6.986 |
| 1.5 | 1513.3 | 6.987 |
| 1.5 | 1478.3 | 6.987 |
| 2 | 2061.7 | 6.989 |
| 2 | 2247.9 | 6.99 |
| 2 | 2440.8 | 6.992 |
| 2.5 | 2589.9 | 6.991 |
| 2.5 | 2567.7 | 6.99 |
| 2.5 | 2679.1 | 6.99 |

Tabla 10. Valores promedios del benceno para la curva de calibración

| Tolueno | | |
|-------------------|---------|------------------|
| Concentración (%) | Área CG | Tiempo retención |
| 5 | 5037 | 9.475 |
| 5 | 4712.6 | 9.472 |
| 5 | 5611.7 | 9.48 |
| 10 | 11354 | 9.515 |
| 10 | 11504.7 | 9.516 |
| 10 | 10769.4 | 9.513 |
| 12.5 | 15547.5 | 9.536 |
| 12.5 | 15620.1 | 9.536 |
| 12.5 | 15385.3 | 9.535 |
| 15 | 18489.7 | 9.549 |
| 15 | 18349.1 | 9.549 |
| 15 | 18100.5 | 9.547 |
| 20 | 22185.6 | 9.563 |
| 20 | 22641.5 | 9.565 |
| 20 | 23889 | 9.569 |

Tabla 11. Valores promedios del m-xileno para la curva de calibración

| m-xileno | | |
|-------------------|---------|------------------|
| Concentración (%) | Área CG | Tiempo retención |
| 0.5 | 99 | 12.614 |
| 0.5 | 101.3 | 12.615 |
| 0.5 | 103.6 | 12.615 |
| 1 | 209.1 | 12.619 |
| 1 | 209.8 | 12.62 |
| 1 | 207.6 | 12.62 |
| 1.5 | 330.7 | 12.625 |
| 1.5 | 310.1 | 12.624 |
| 1.5 | 320.2 | 12.623 |
| 2 | 406.4 | 12.625 |
| 2 | 417.1 | 12.624 |
| 2 | 414.9 | 12.624 |
| 2.5 | 487.6 | 12.627 |
| 2.5 | 478.4 | 12.626 |
| 2.5 | 482.5 | 12.628 |

Tabla 12. Valores promedios del p-xileno para la curva de calibración

| p-xileno | | |
|-------------------|---------|------------------|
| Concentración (%) | Área CG | Tiempo retención |
| 0.5 | 94 | 12.971 |
| 0.5 | 96.3 | 12.972 |
| 0.5 | 98.6 | 12.972 |
| 1 | 199.2 | 12.976 |
| 1 | 200.1 | 12.978 |
| 1 | 197.8 | 12.978 |
| 1.5 | 315.6 | 12.982 |
| 1.5 | 295.9 | 12.983 |
| 1.5 | 305.6 | 12.982 |
| 2 | 387.2 | 12.984 |
| 2 | 397.4 | 12.984 |
| 2 | 395.4 | 12.983 |
| 2.5 | 462.5 | 12.986 |
| 2.5 | 454 | 12.986 |
| 2.5 | 457.7 | 12.987 |

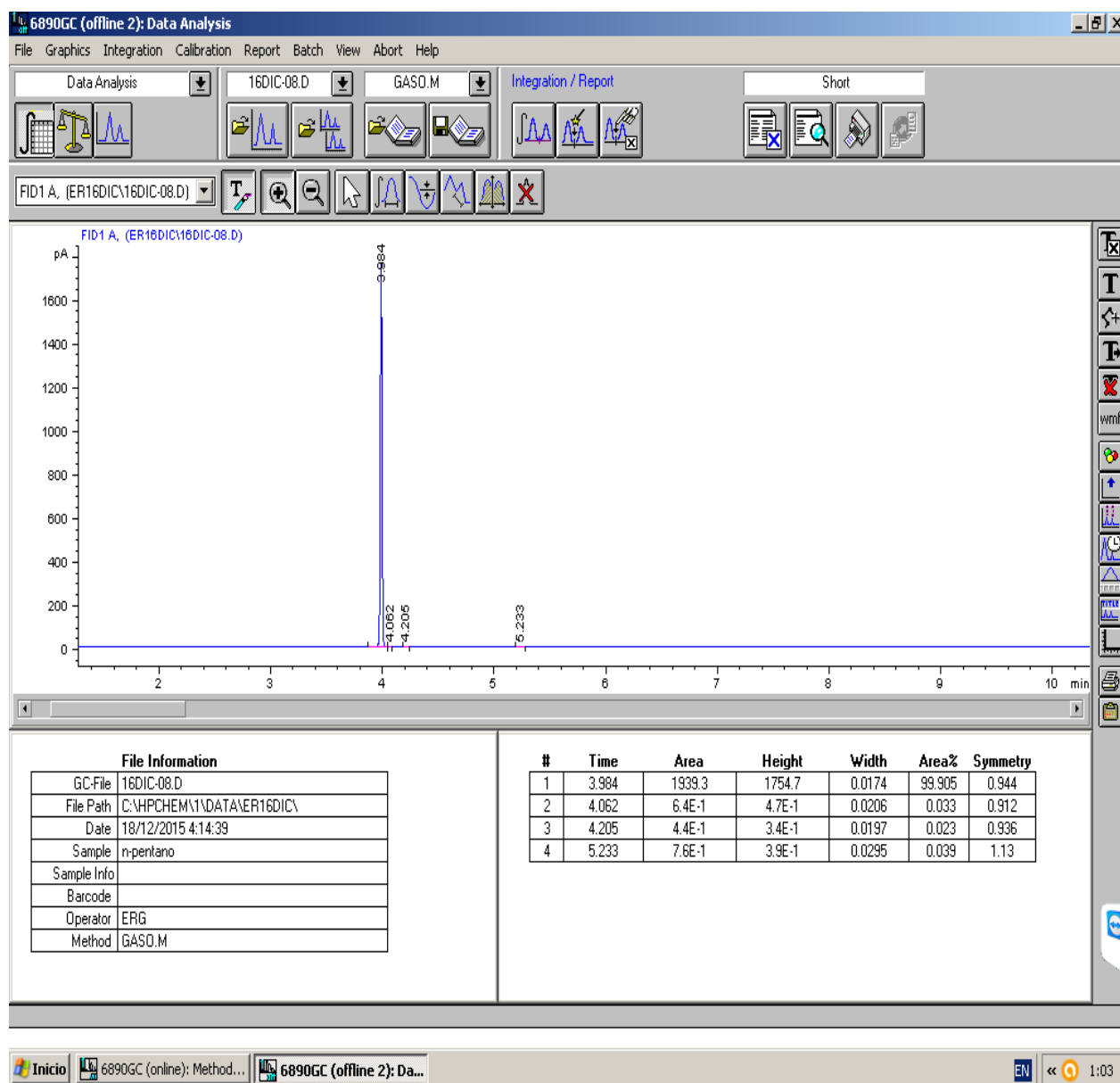
Tabla 13. Valores promedios del o-xileno para la curva de calibración

| o-xileno | | |
|-------------------|---------|------------------|
| Concentración (%) | Área CG | Tiempo retención |
| 0.5 | 306.4 | 13.288 |
| 0.5 | 313.8 | 13.289 |
| 0.5 | 321.1 | 13.289 |
| 1 | 647.5 | 13.3 |
| 1 | 650 | 13.302 |
| 1 | 643.2 | 13.302 |
| 1.5 | 1025.1 | 13.313 |
| 1.5 | 961.7 | 13.311 |
| 1.5 | 992.7 | 13.311 |
| 2 | 1261.2 | 13.319 |
| 2 | 1295 | 13.319 |
| 2 | 1288.3 | 13.319 |
| 2.5 | 1515.1 | 13.326 |
| 2.5 | 1486.4 | 13.324 |
| 2.5 | 1498.7 | 13.326 |

Anexo 4. Cromatogramas de los compuestos puros grado reactivo

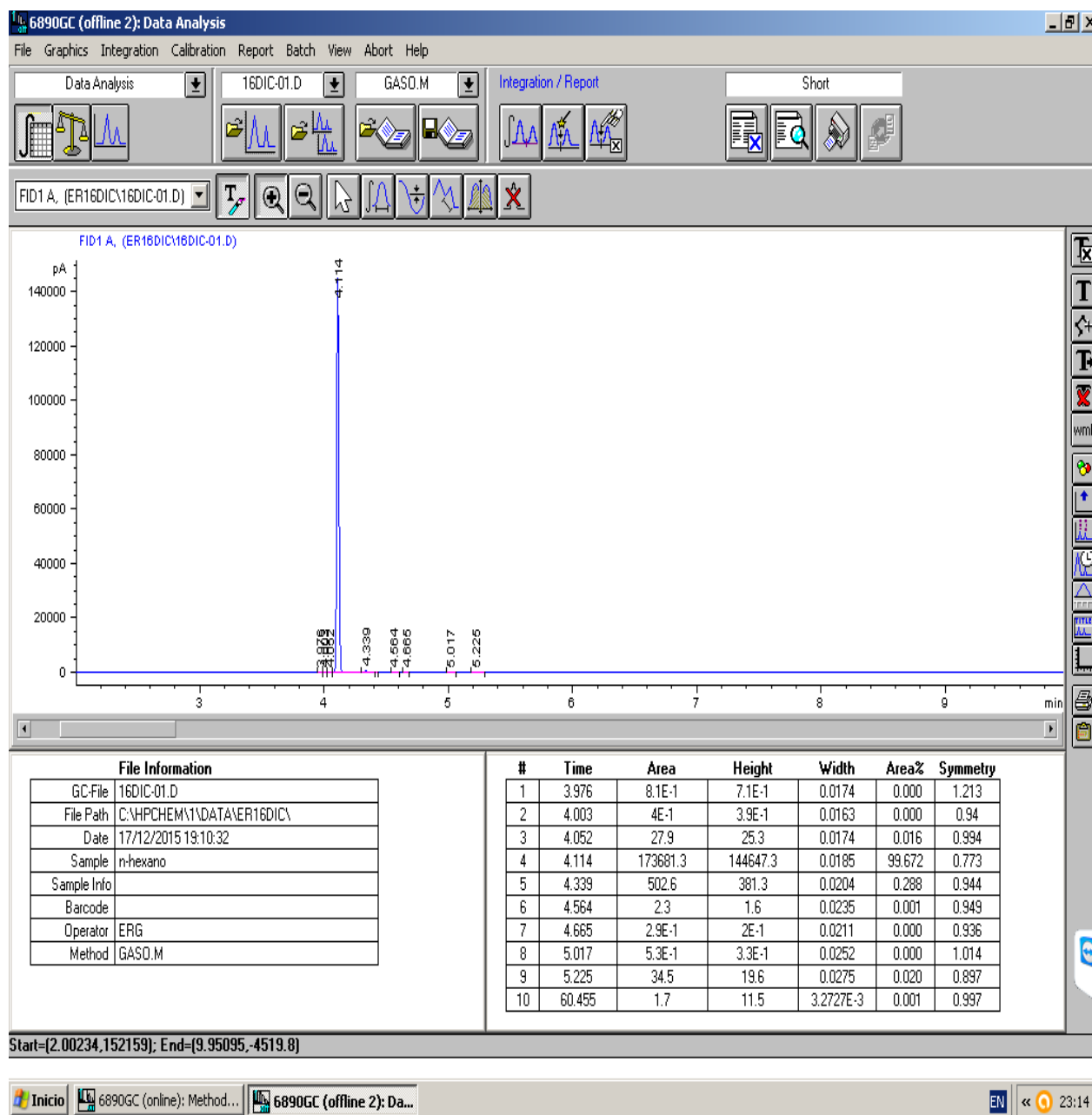
El análisis de la muestra fue practicado en un Cromatógrafo Hewlett Packard 6890 con detector de ionización de flama (FID), Presiones del gas de Helio: 80 psi, Hidrógeno 40 psi y de aire: 80 psi. La temperatura de la columna fue de 70 °C, y la del inyector de 160 °C, con columna Capilar DB-WAX 30 m * 0.25 mm. Con un flujo de gases de aire: 240 ml/min, hidrógeno: 30 ml/min y helio: 20 ml/min y el volumen de inyección fue de 1 µL.

Figura 39. Cromatograma del n-pentano marca Sigma Aldrich grado reactivo.



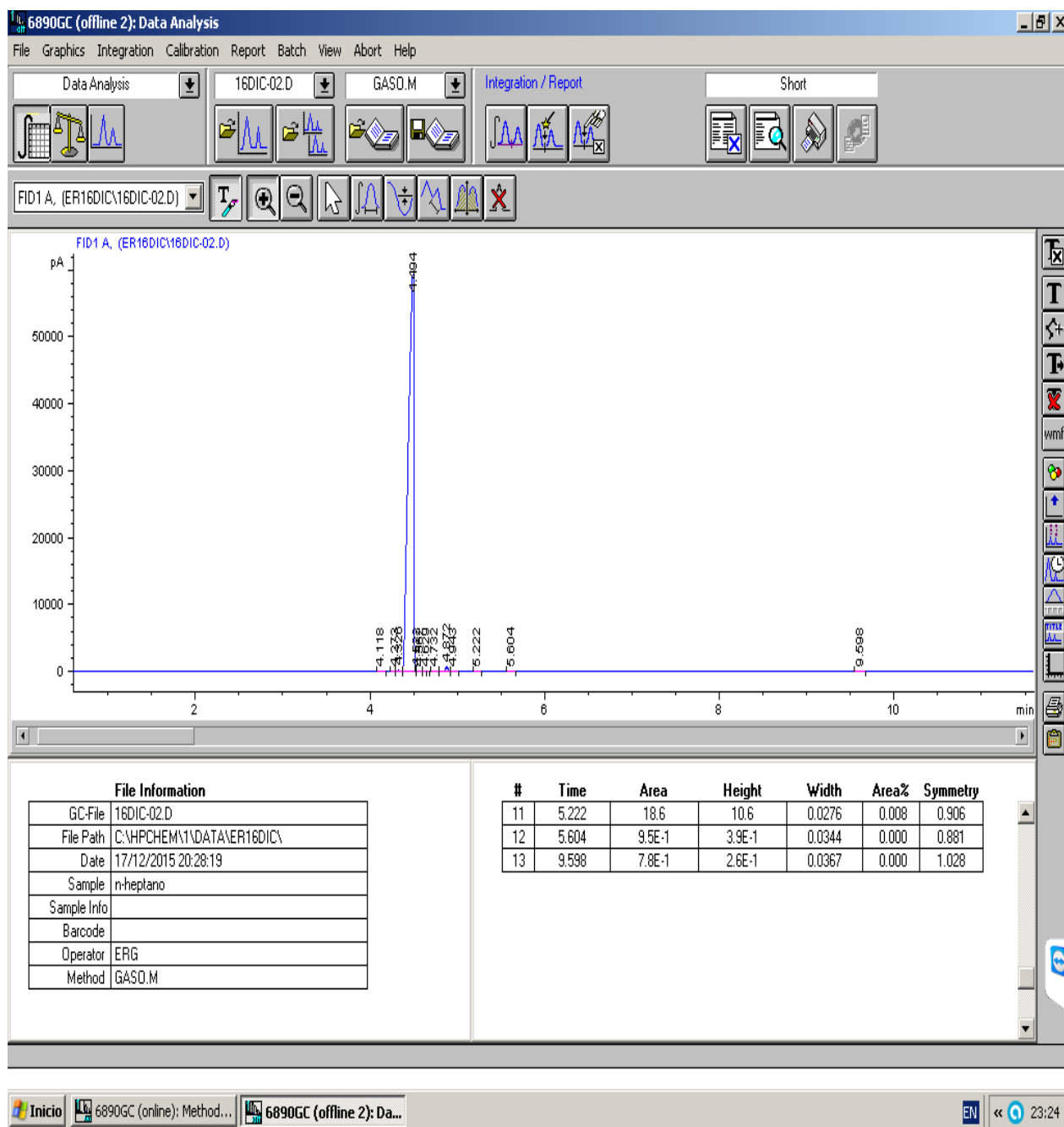
Fuente: ChemStation 10.01

Figura 40. Cromatograma del n-hexano marca Sigma Aldrich grado reactivo.



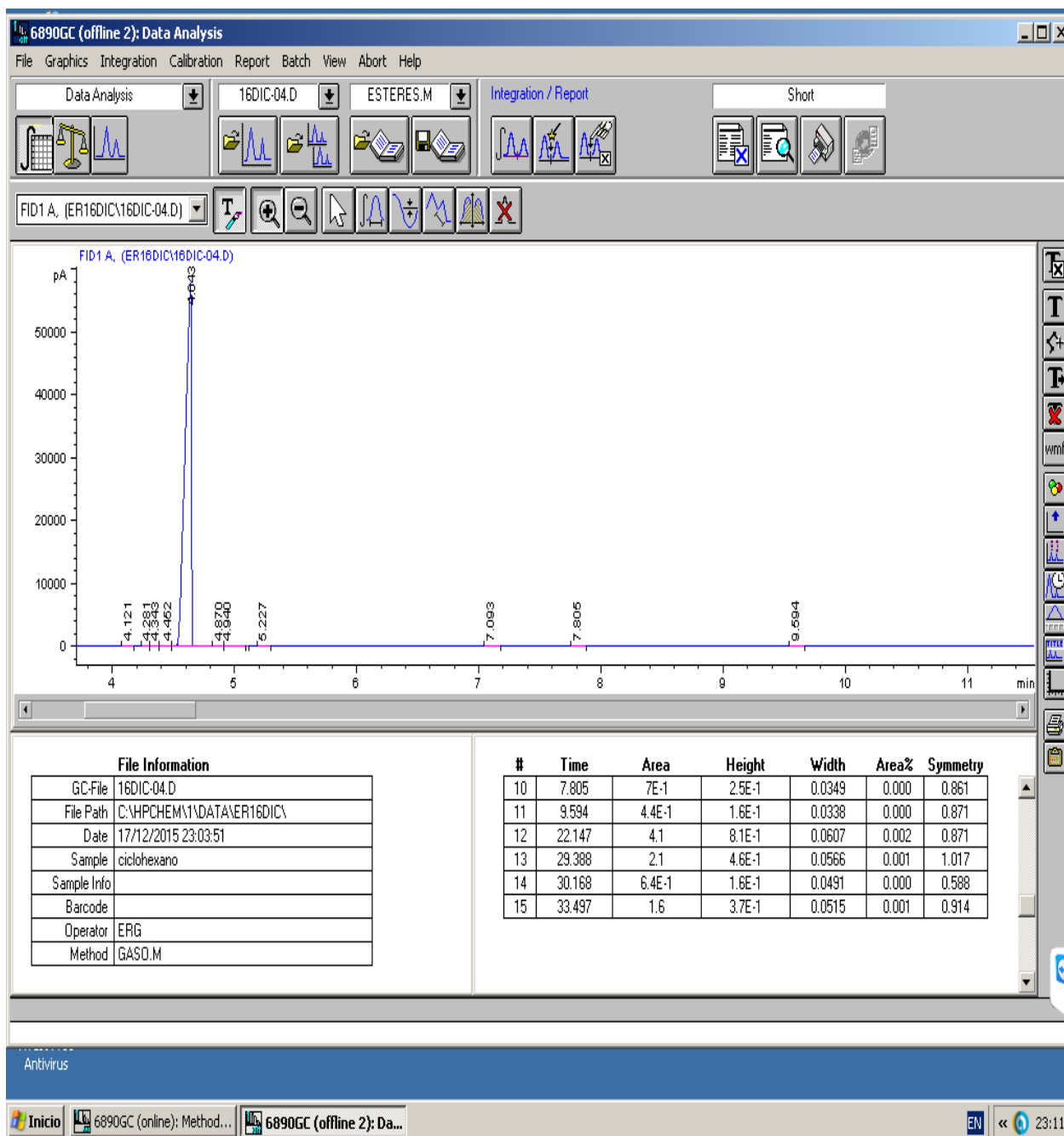
Fuente: ChemStation 10.01

Figura 41. Cromatograma del n-heptano marca Sigma Aldrich grado reactivo.



Fuente: ChemStation 10.01

Figura 42. Cromatograma del ciclohexano marca Sigma Aldrich grado reactivo.



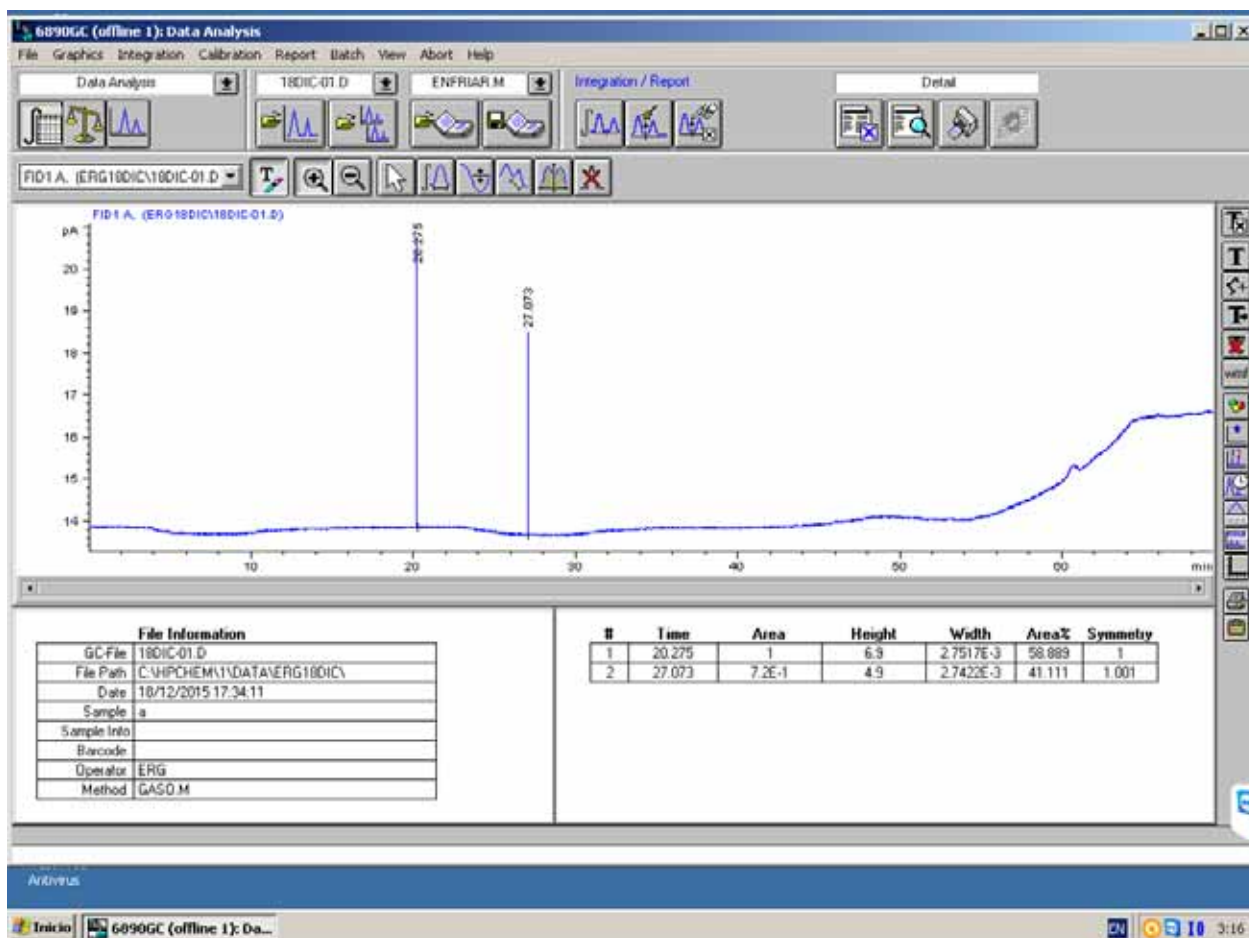
Fuente: ChemStation 10.01

Anexo 5. Cromatogramas de los experimentos de los muestreos

Las muestras de los experimentos que se analizaron en cromatografía de gases se identificaron con base a los compuestos puros de grado reactivo los cuales fueron: benceno, tolueno y los xilenos m, p y o; que son los más tóxicos para la salud humana.

Utilizando un Cromatógrafo Hewlett Packard 6890 con detector de ionización de flama (FID), Presiones del gas de Helio: 80 psi, Hidrógeno 40 psi y de aire: 80 psi. La temperatura de la columna fue de 70 °C, y la del inyector de 160 °C, con columna Capilar DB-WAX 30 m * 0.25 mm. Con un flujo de gases de aire: 240 ml/min, hidrógeno: 30 ml/min y helio: 20 ml/min y el volumen de inyección fue de 1 µL.

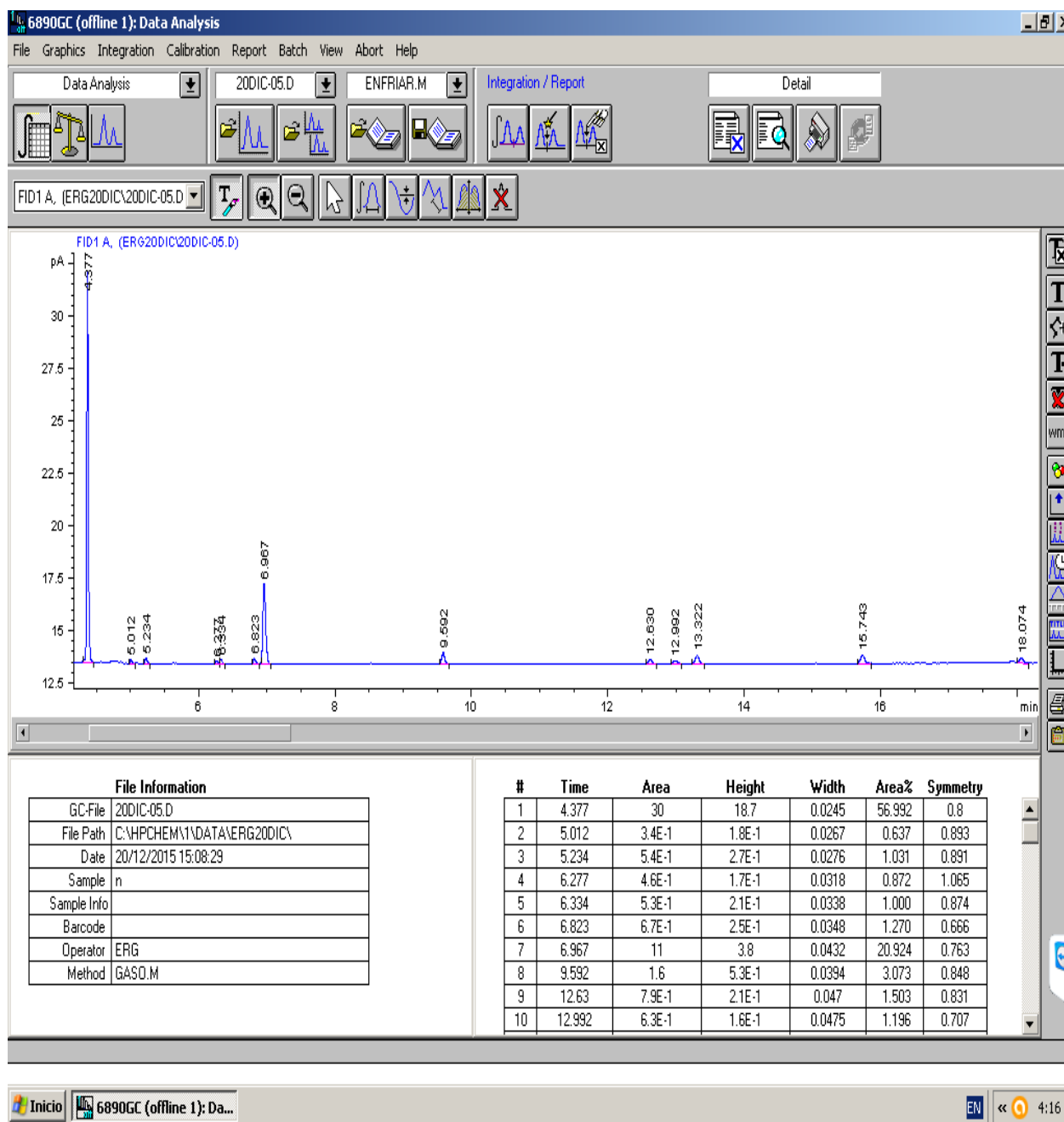
Figura 43. Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior no se identifican alguno de los compuestos utilizados en grado reactivo.

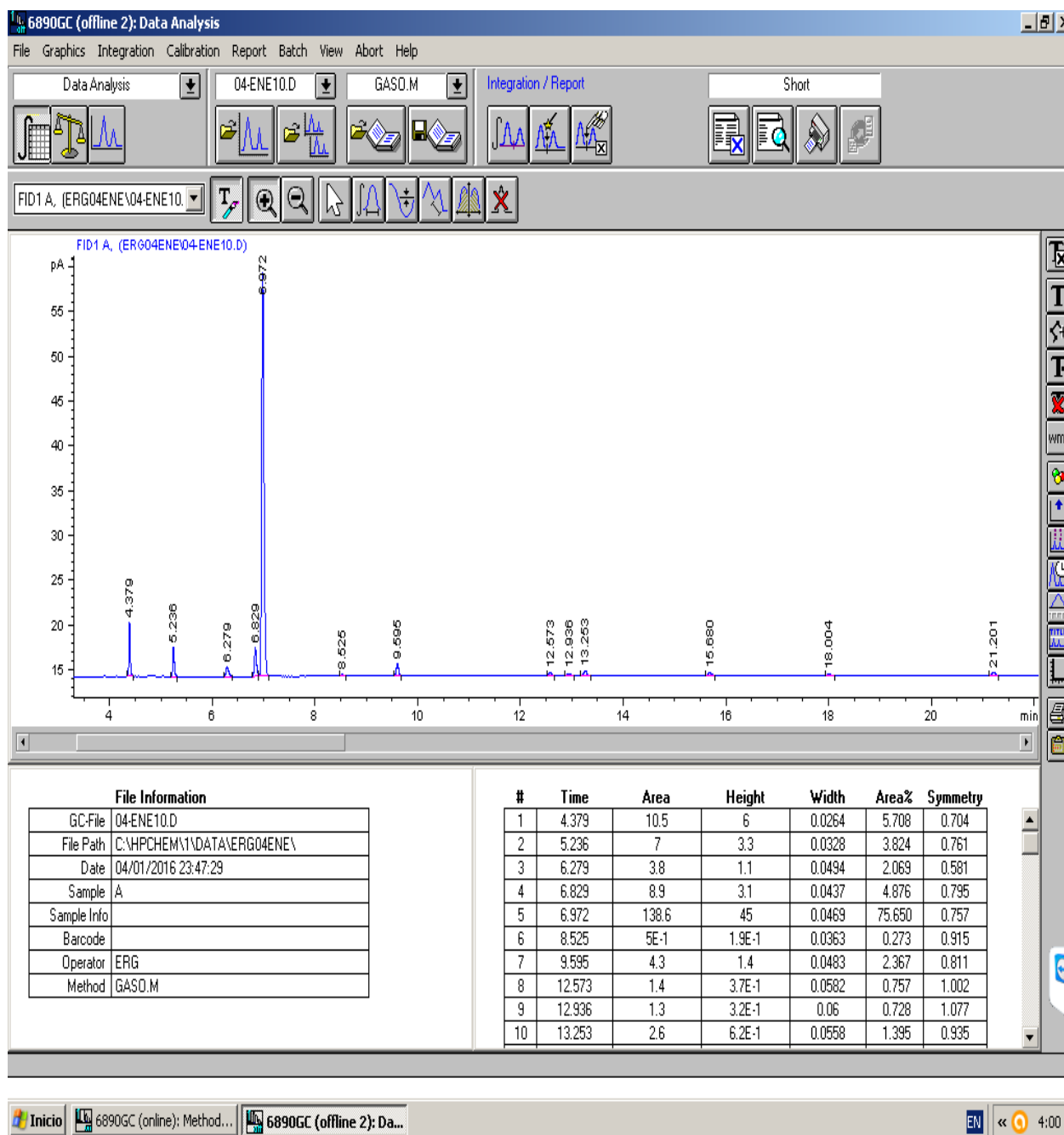
Figura 44. Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias ni nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

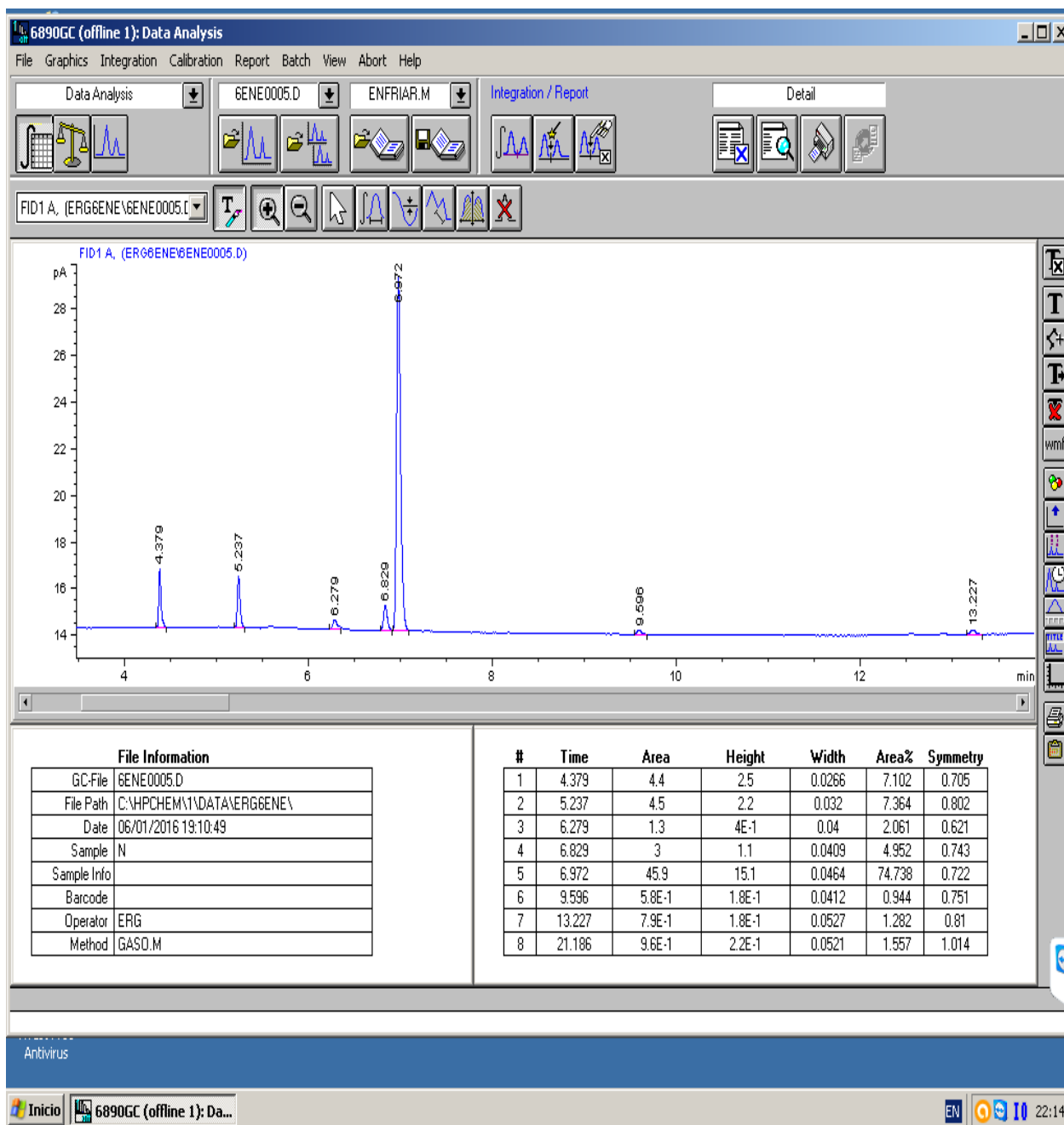
Figura 45. Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias ni nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

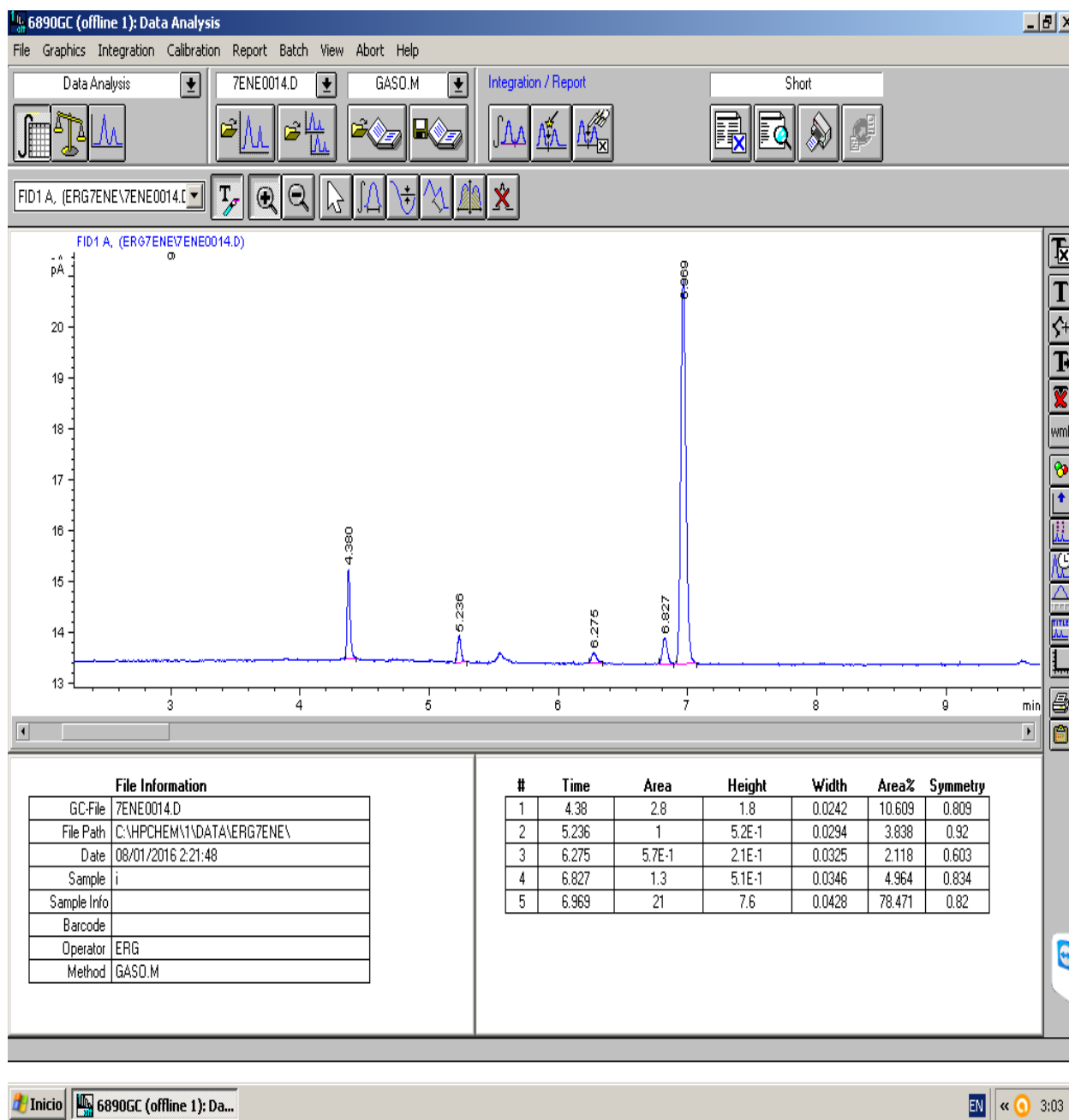
Figura 46. Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias ni nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y el o-xileno.

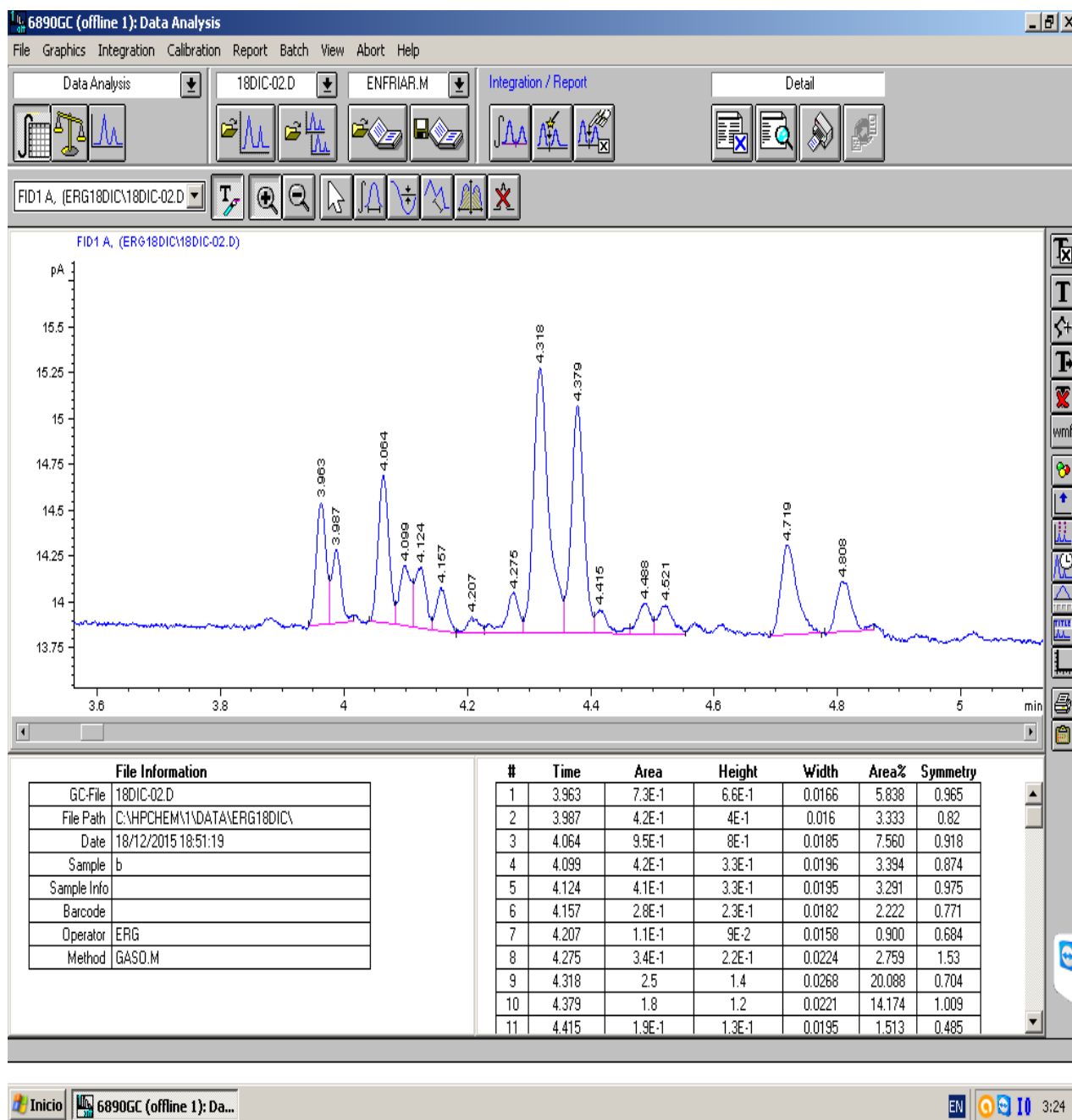
Figura 47. Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno.

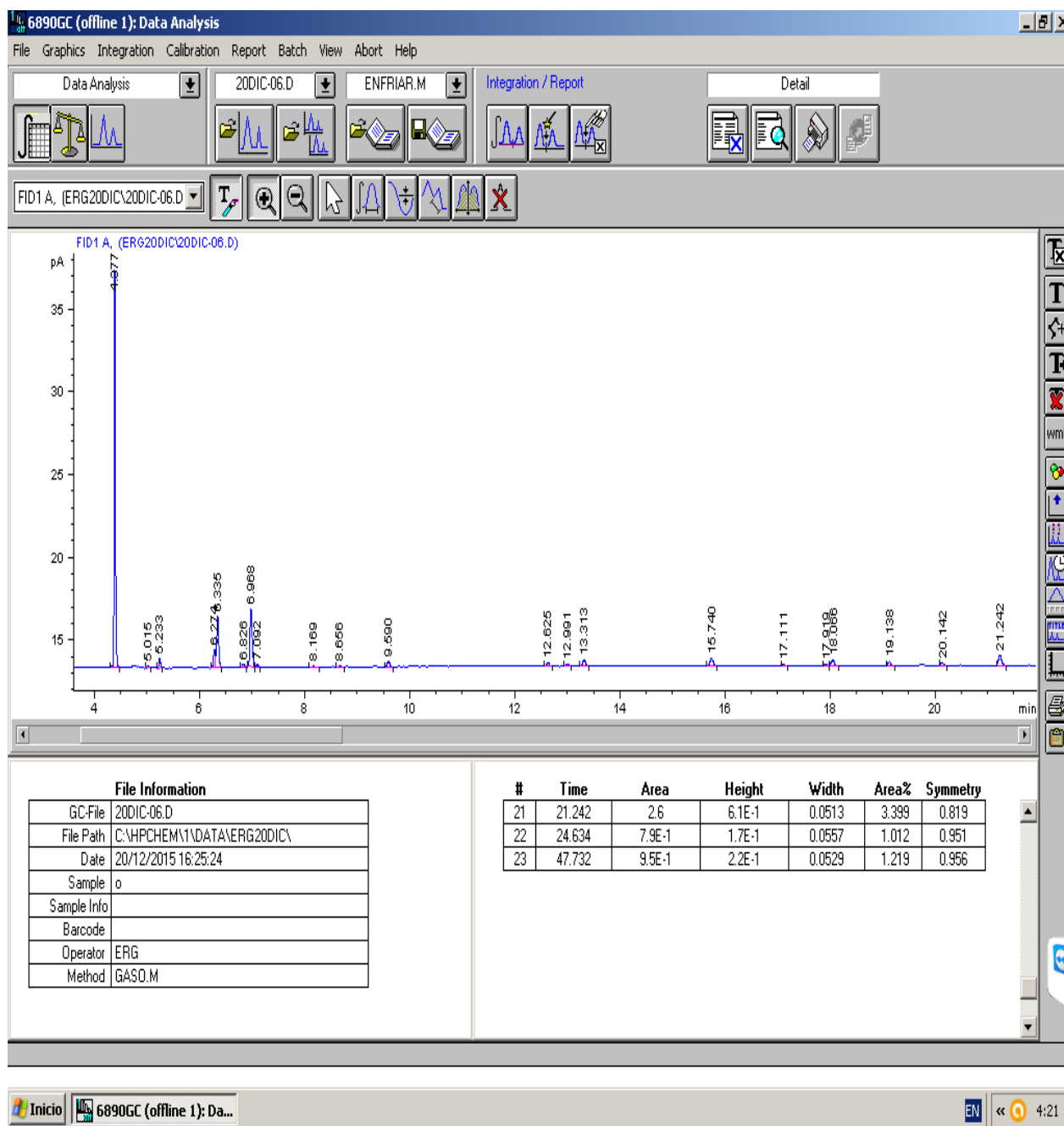
Figura 48. Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-hexano, tolueno y p-xileno.

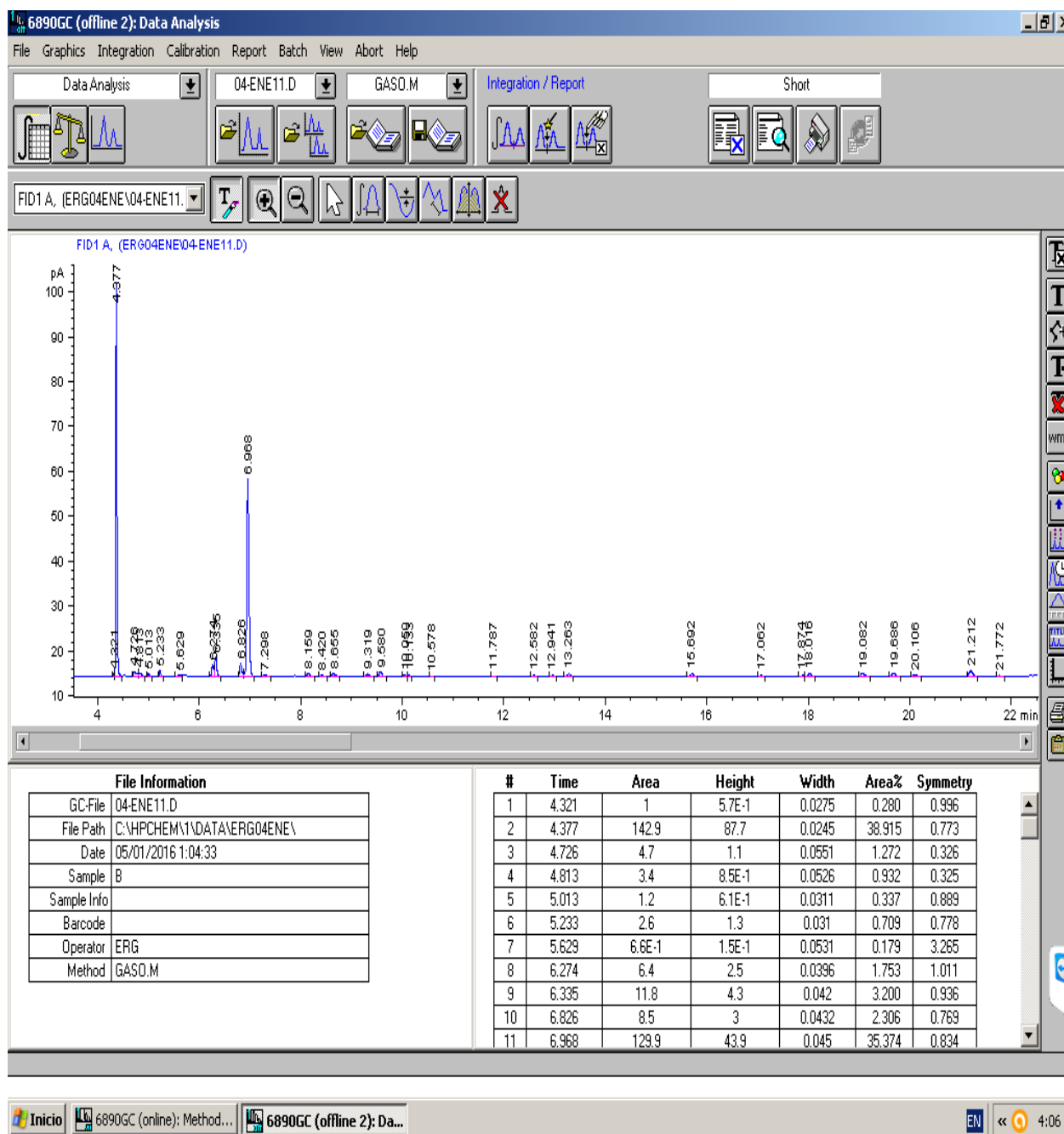
Figura 49. Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

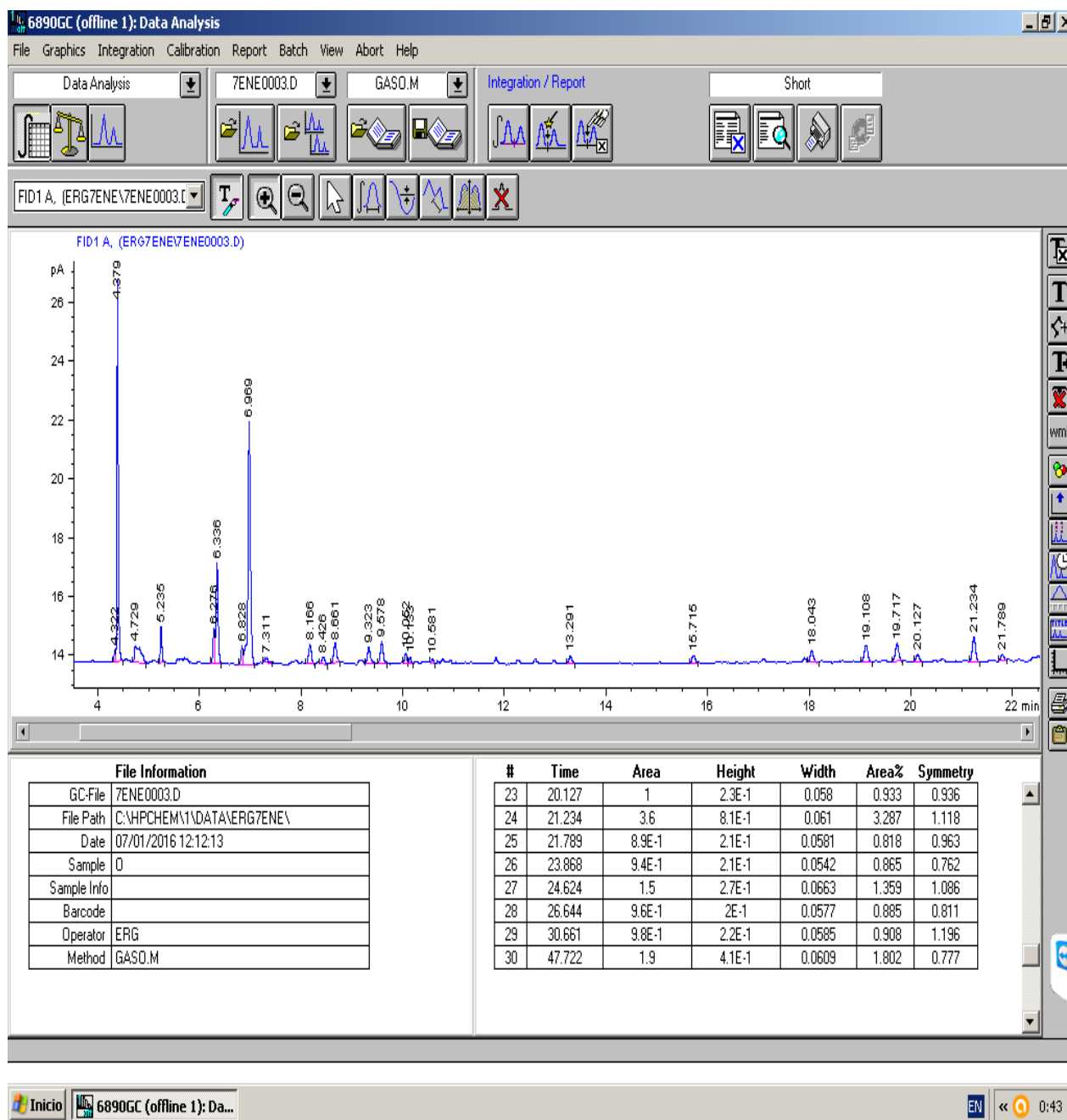
Figura 50. Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos p y o.

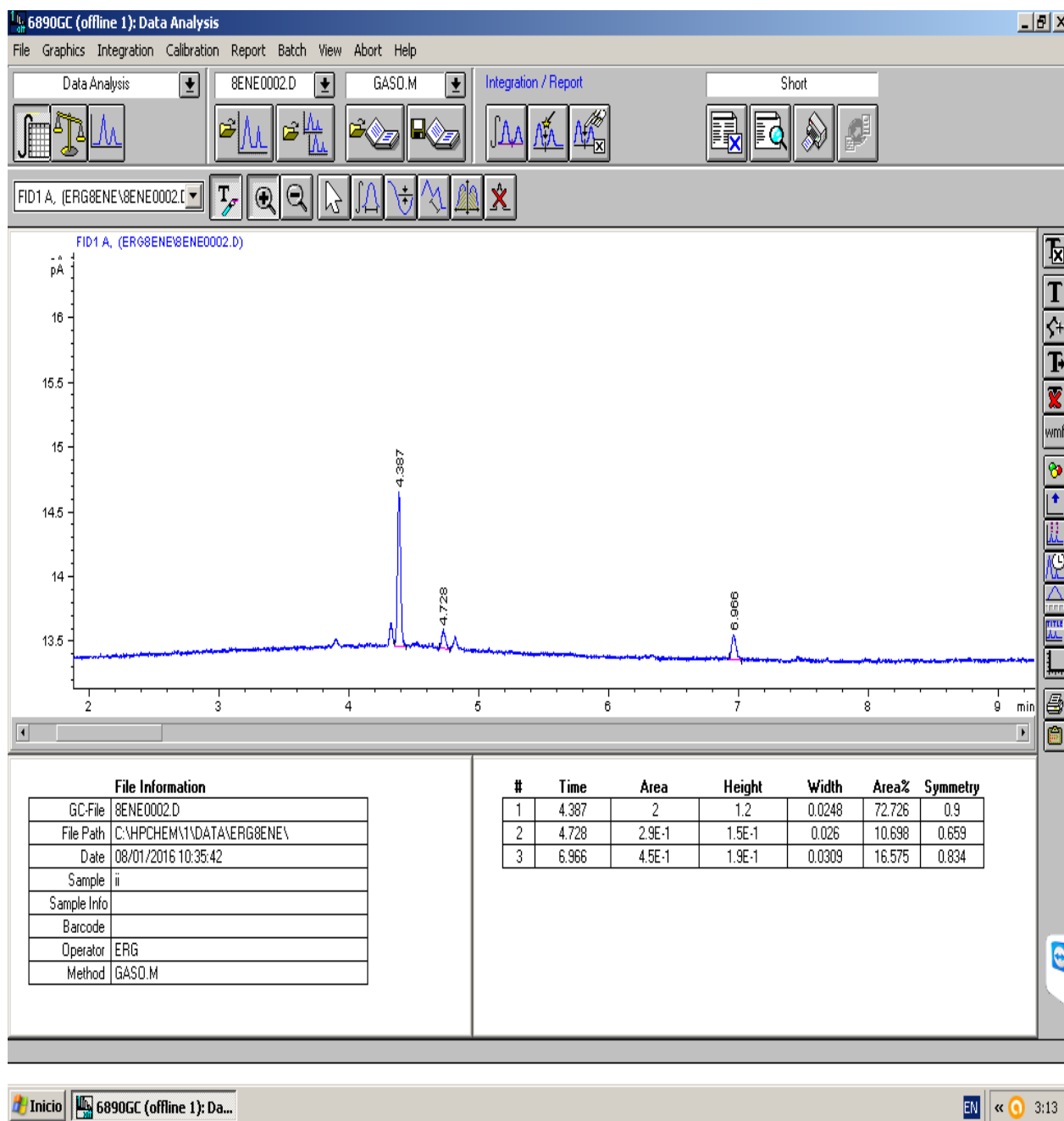
Figura 51. Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y o-xileno.

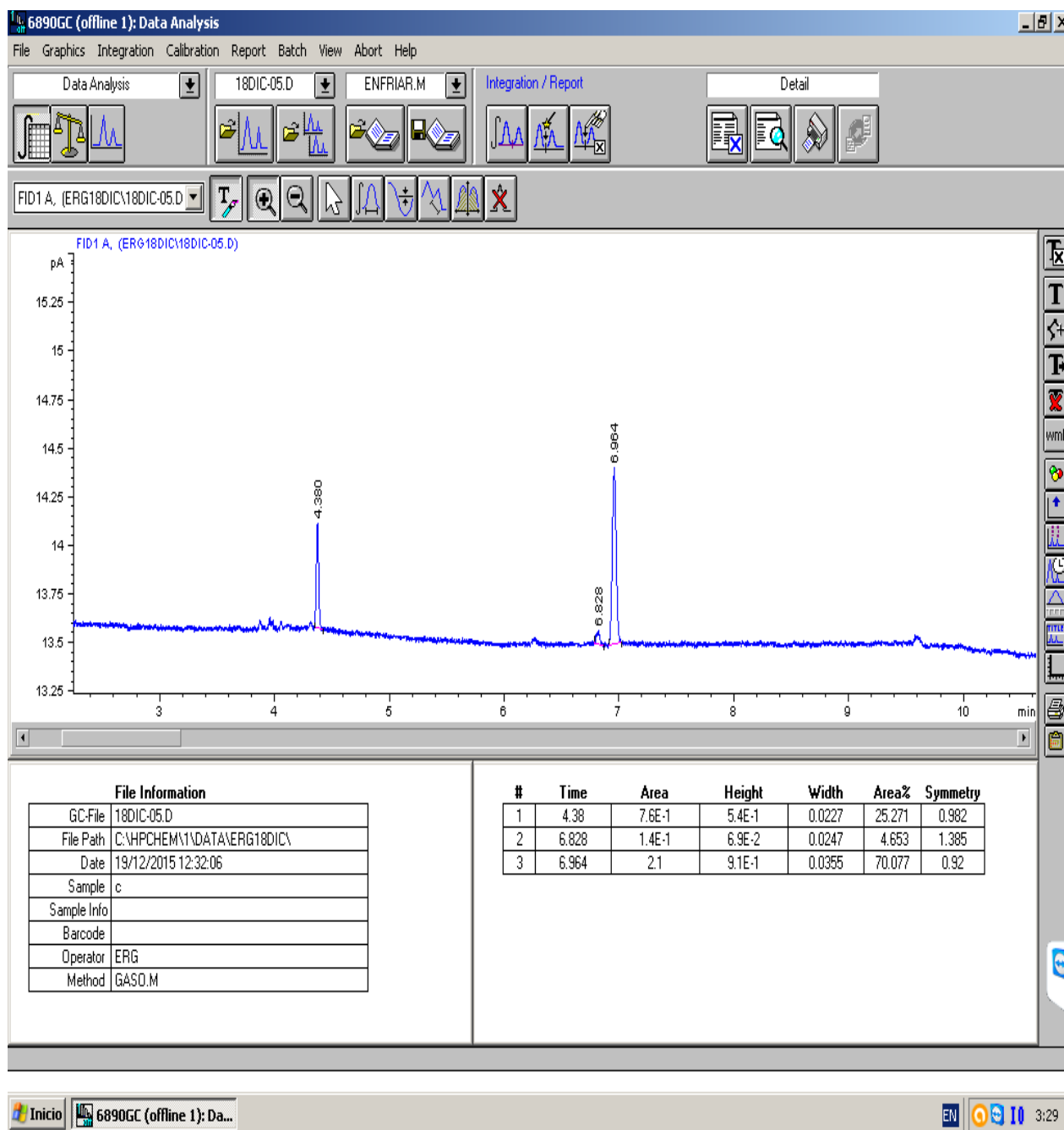
Figura 52. Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

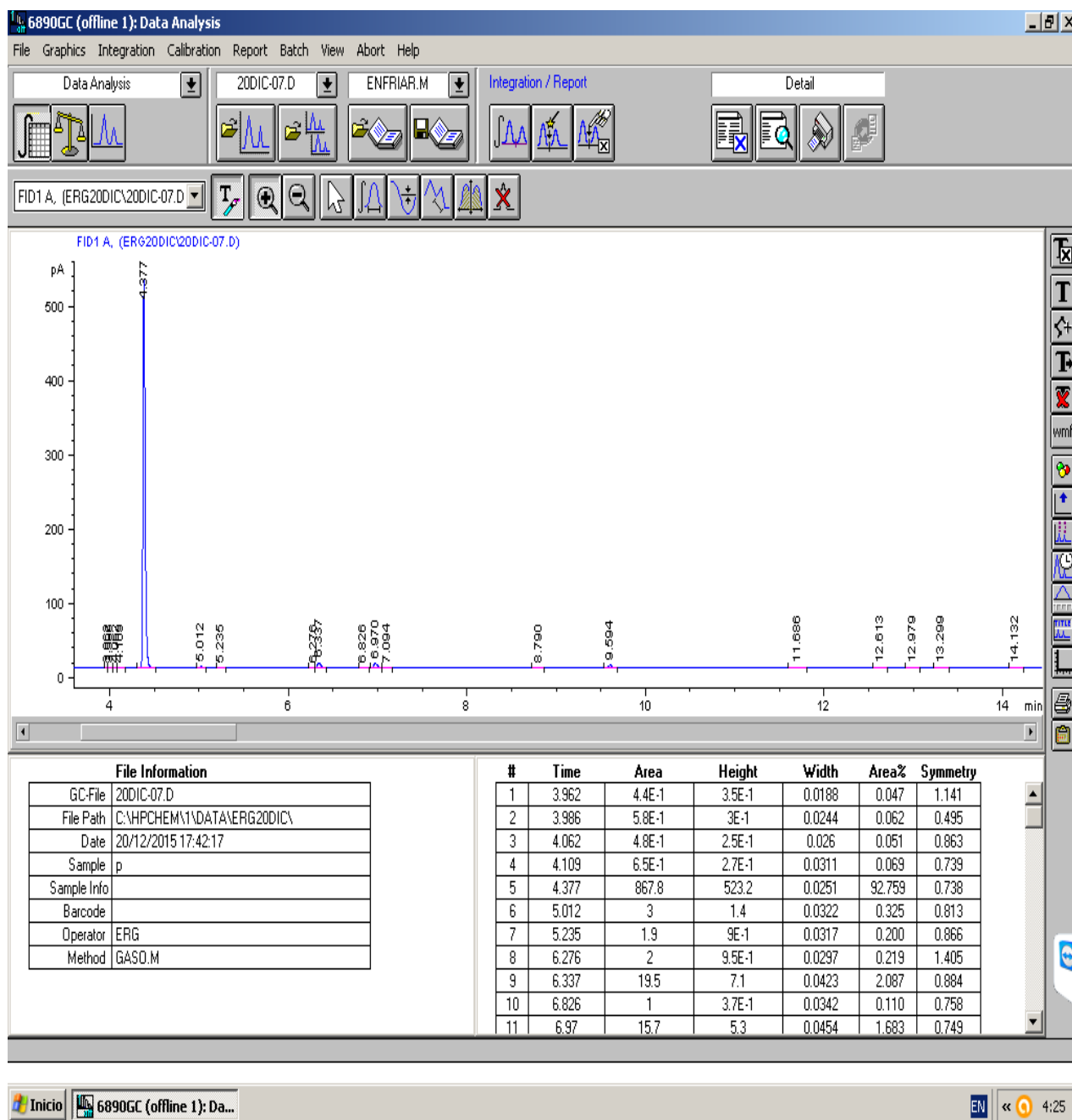
Figura 53. Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

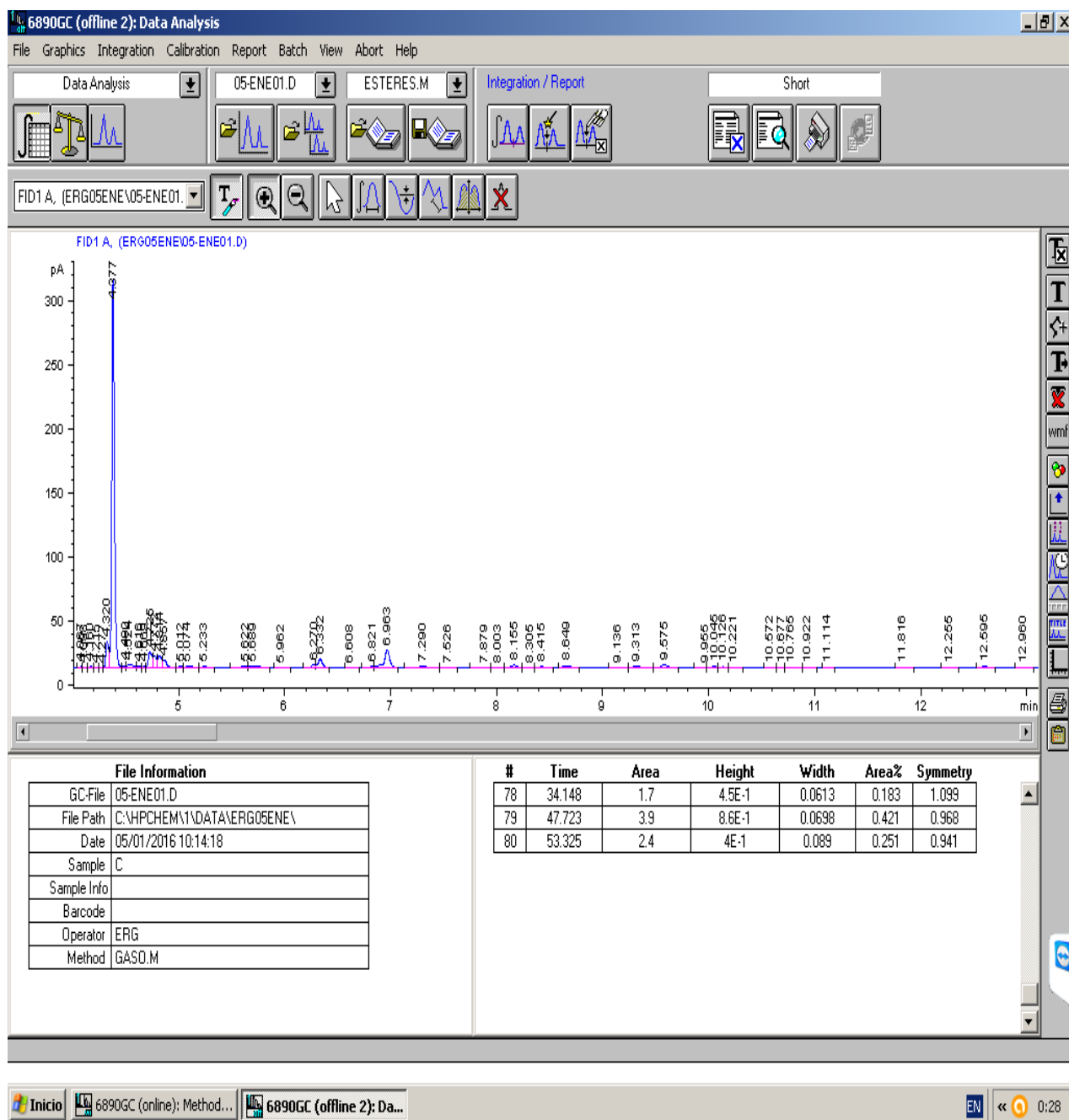
Figura 54. Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-hexano, benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

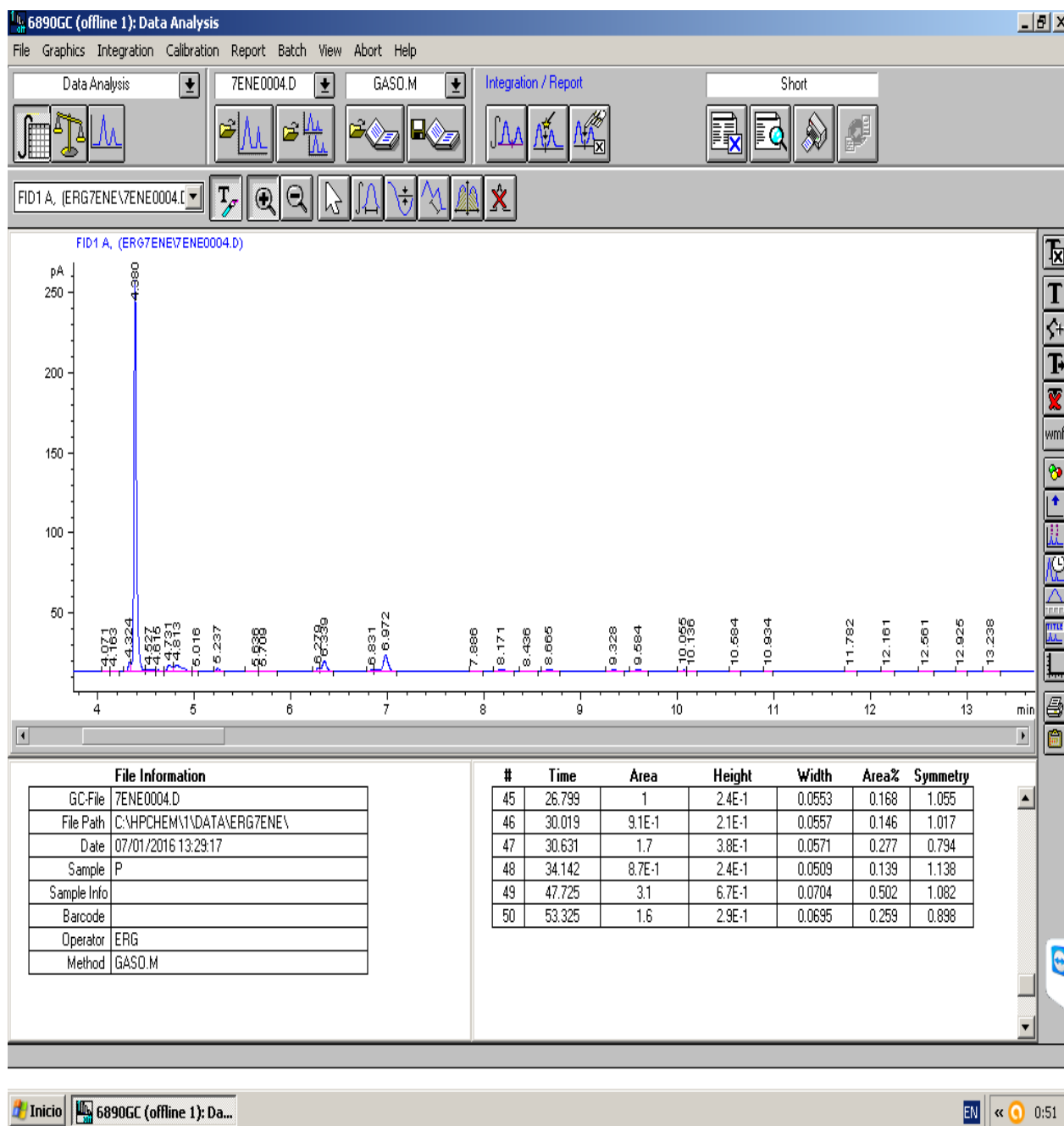
Figura 55. Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, ciclohexano, benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

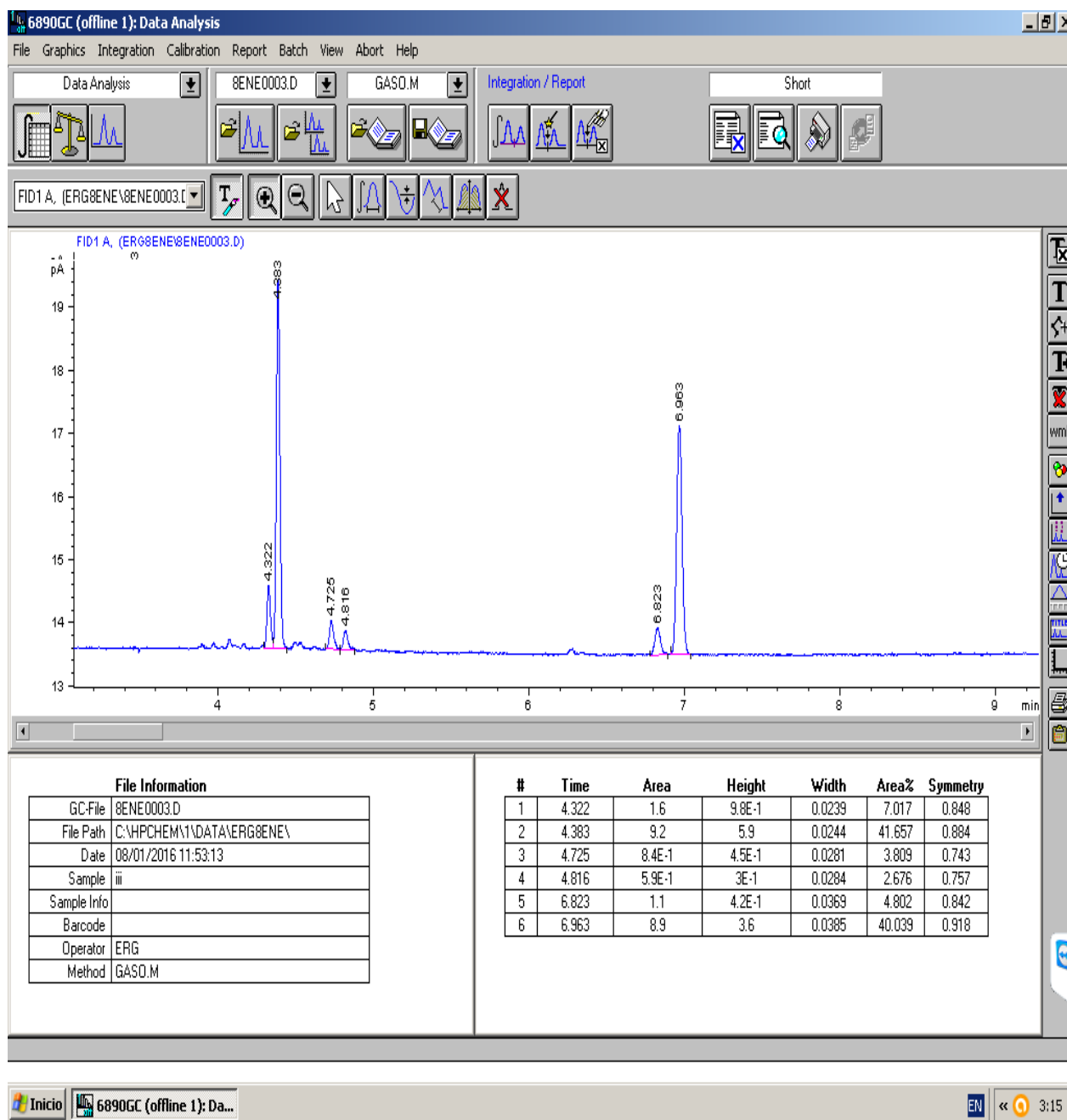
Figura 56. Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

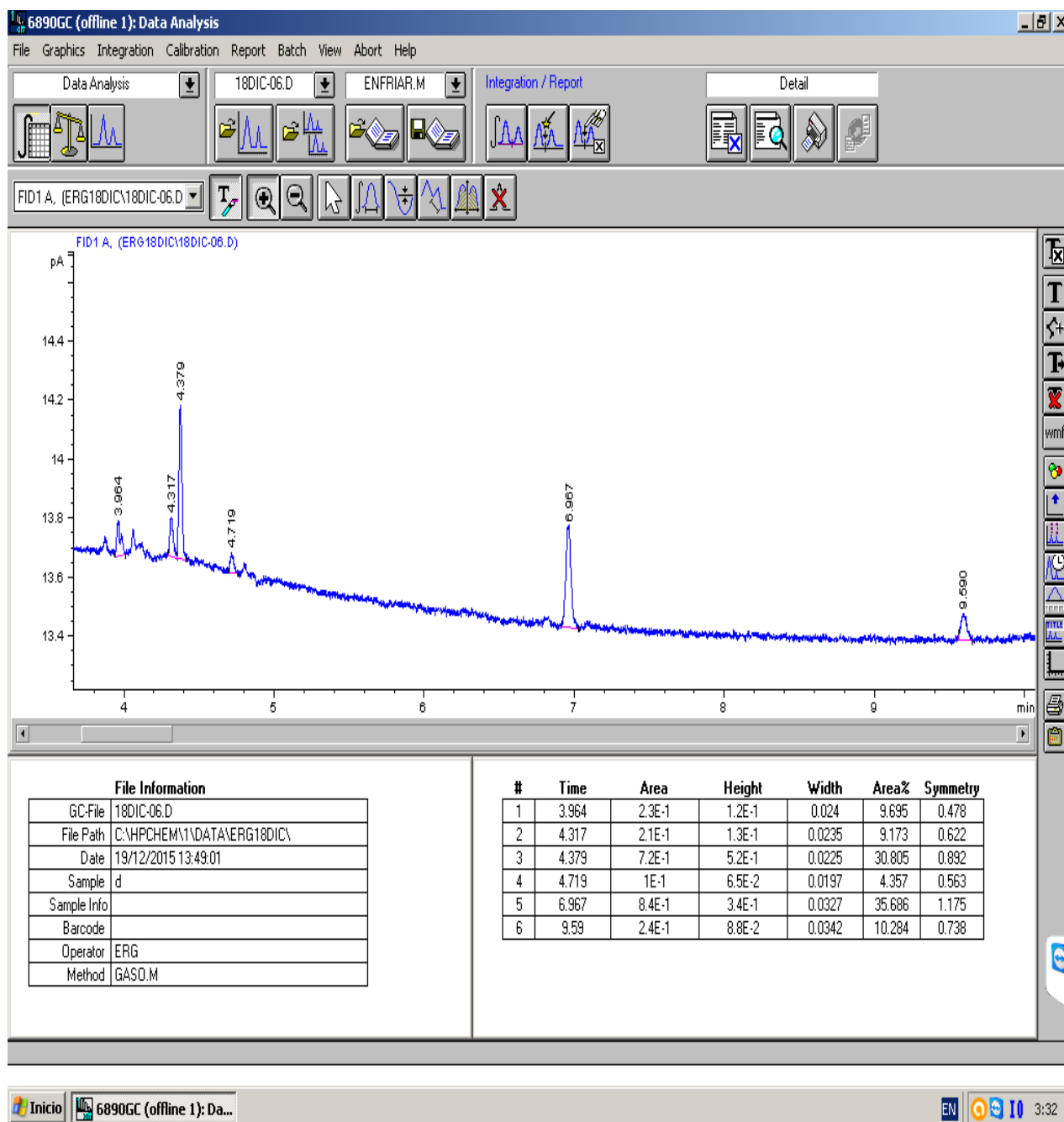
Figura 57. Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

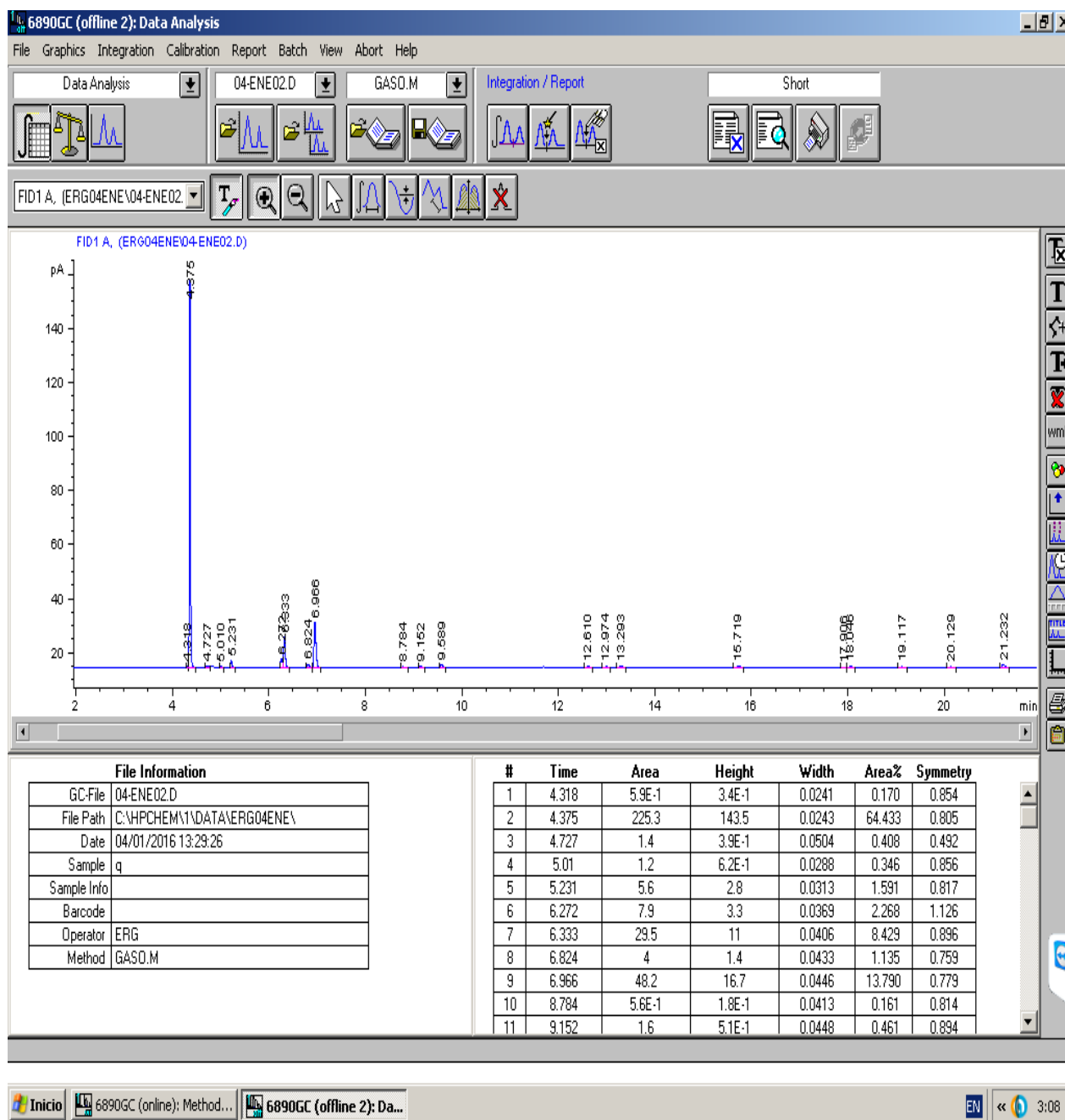
Figura 58. Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

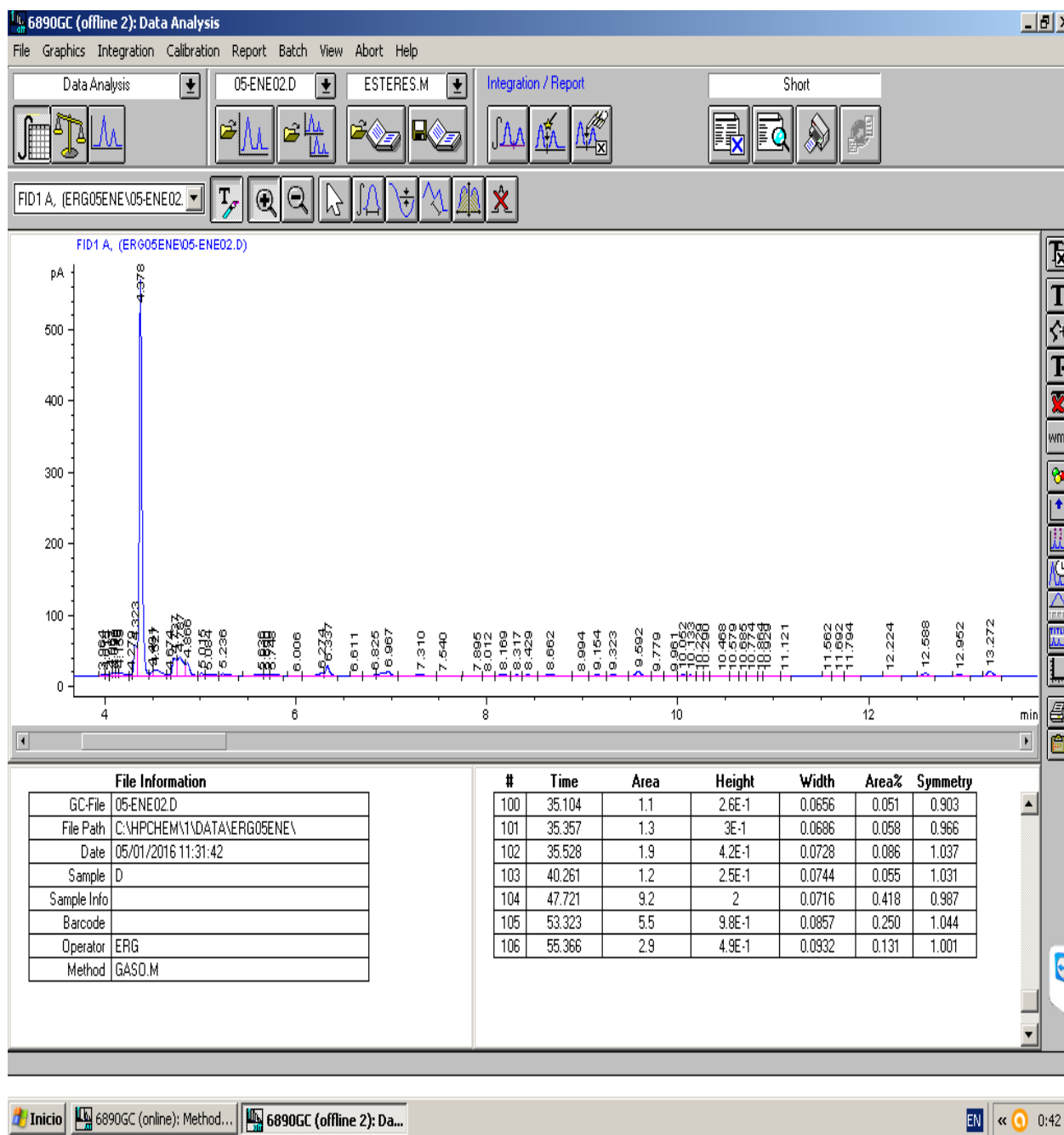
Figura 59. Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los tres xilenos m, p y o.

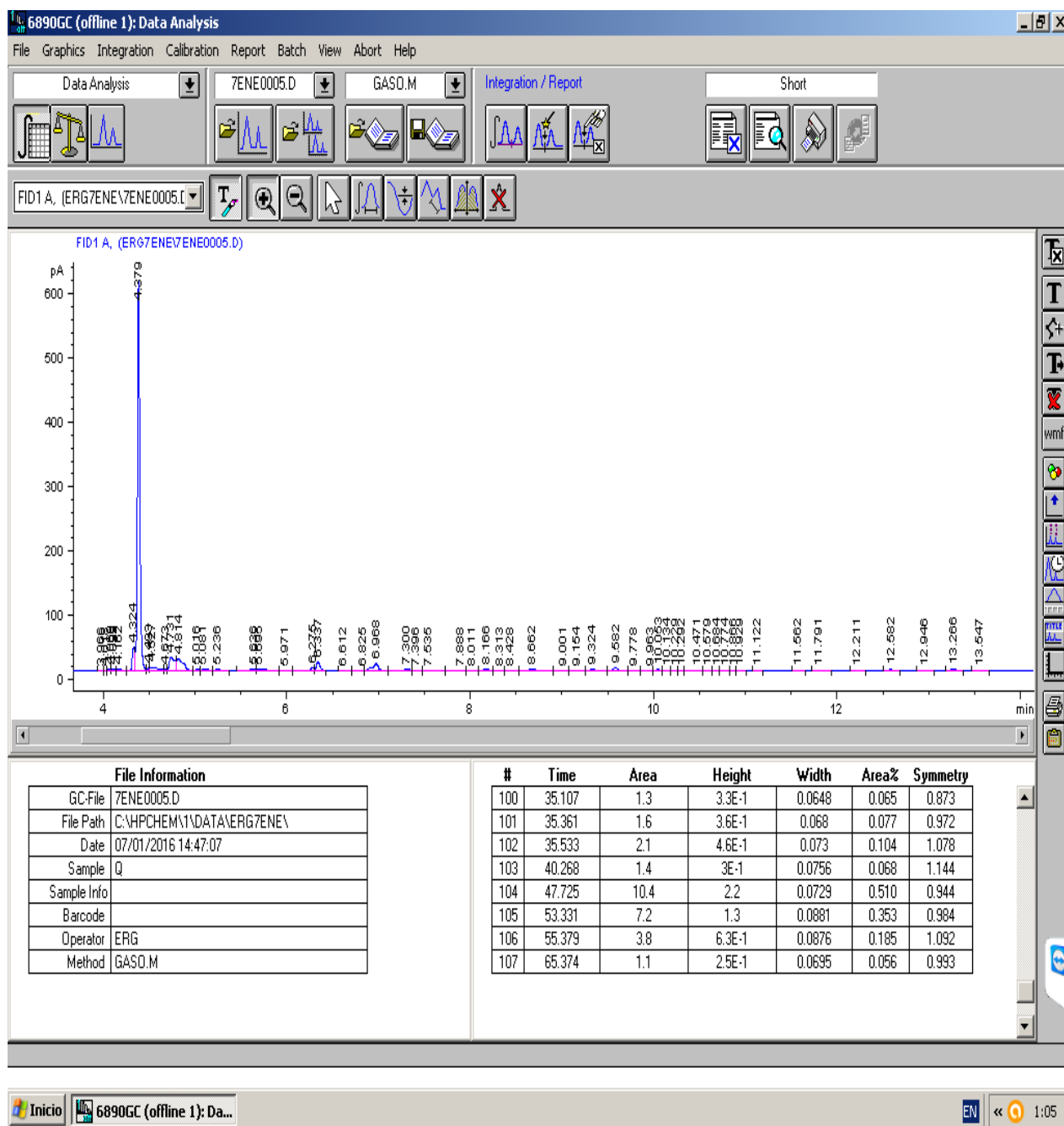
Figura 60. Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

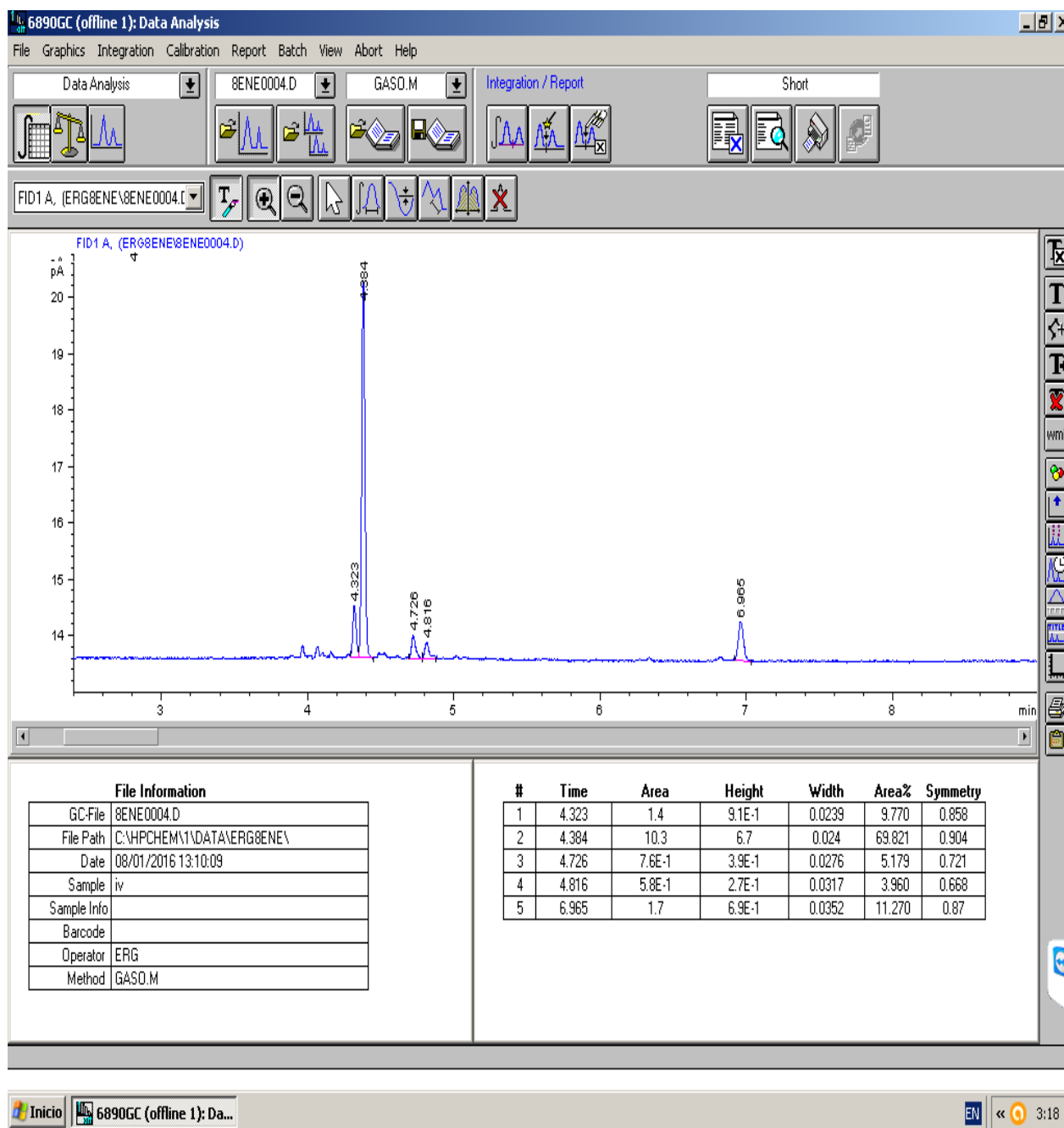
Figura 61. Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

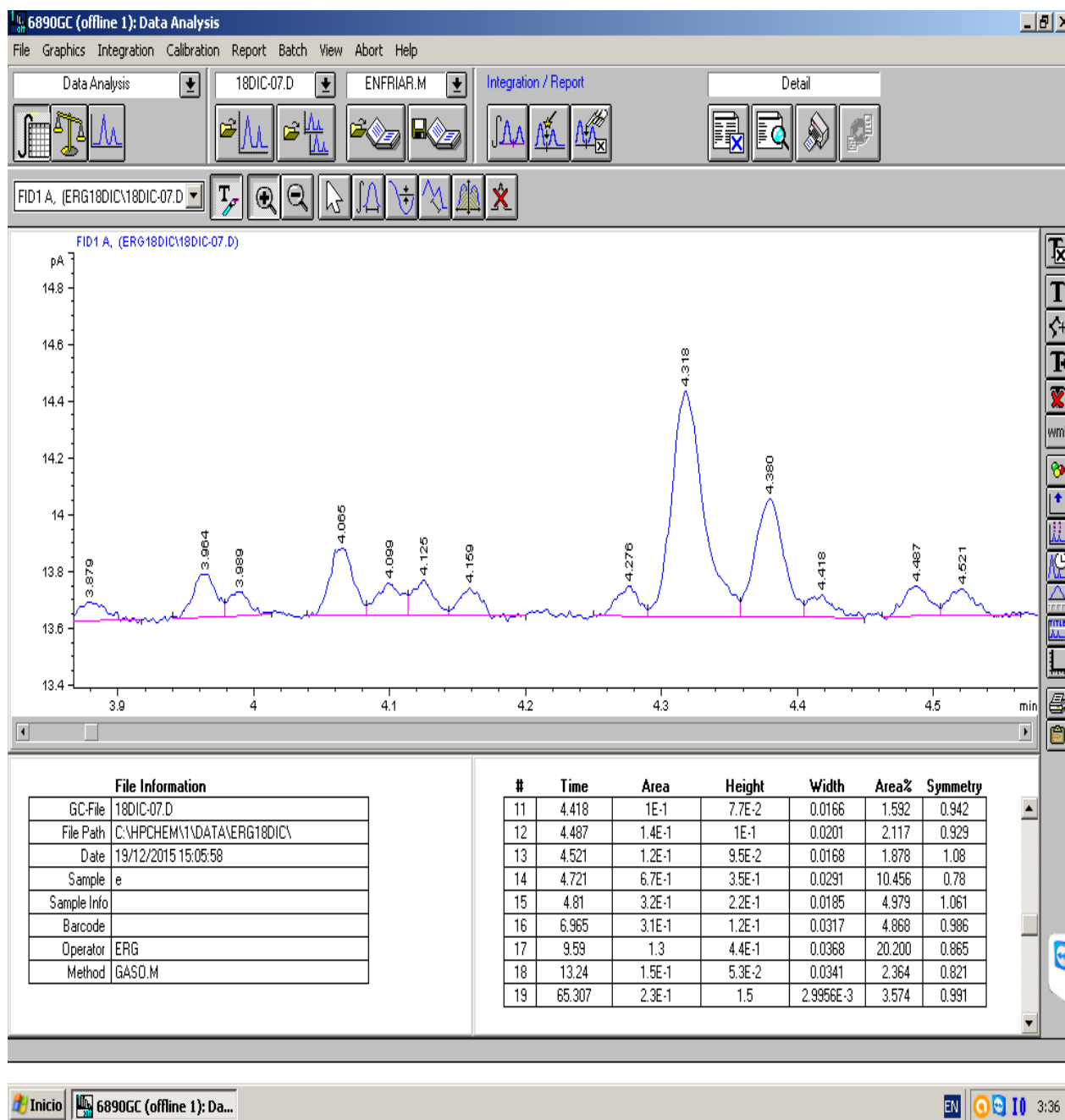
Figura 62. Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

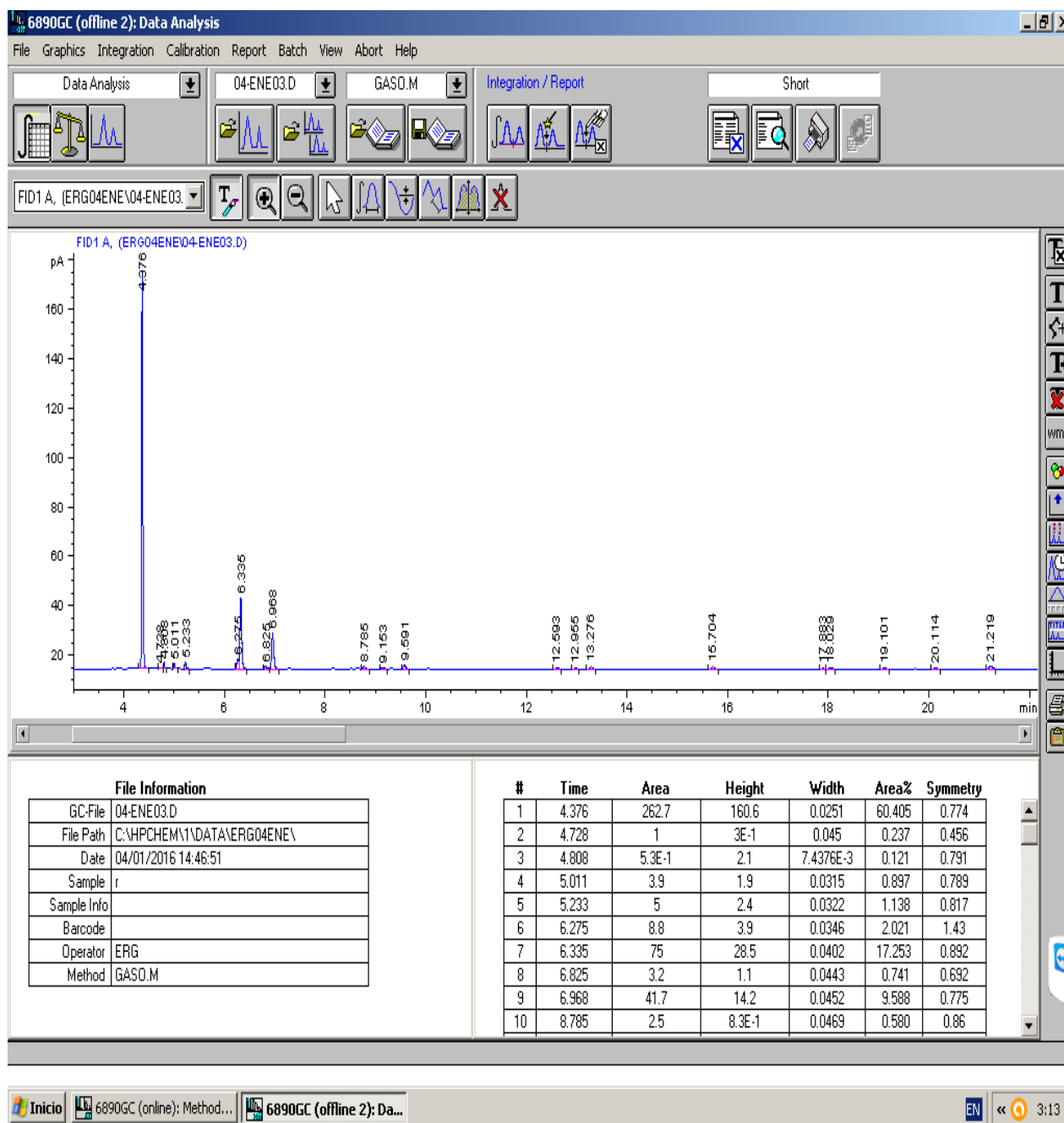
Figura 63. Cromatograma de muestreo del día 0 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y o.

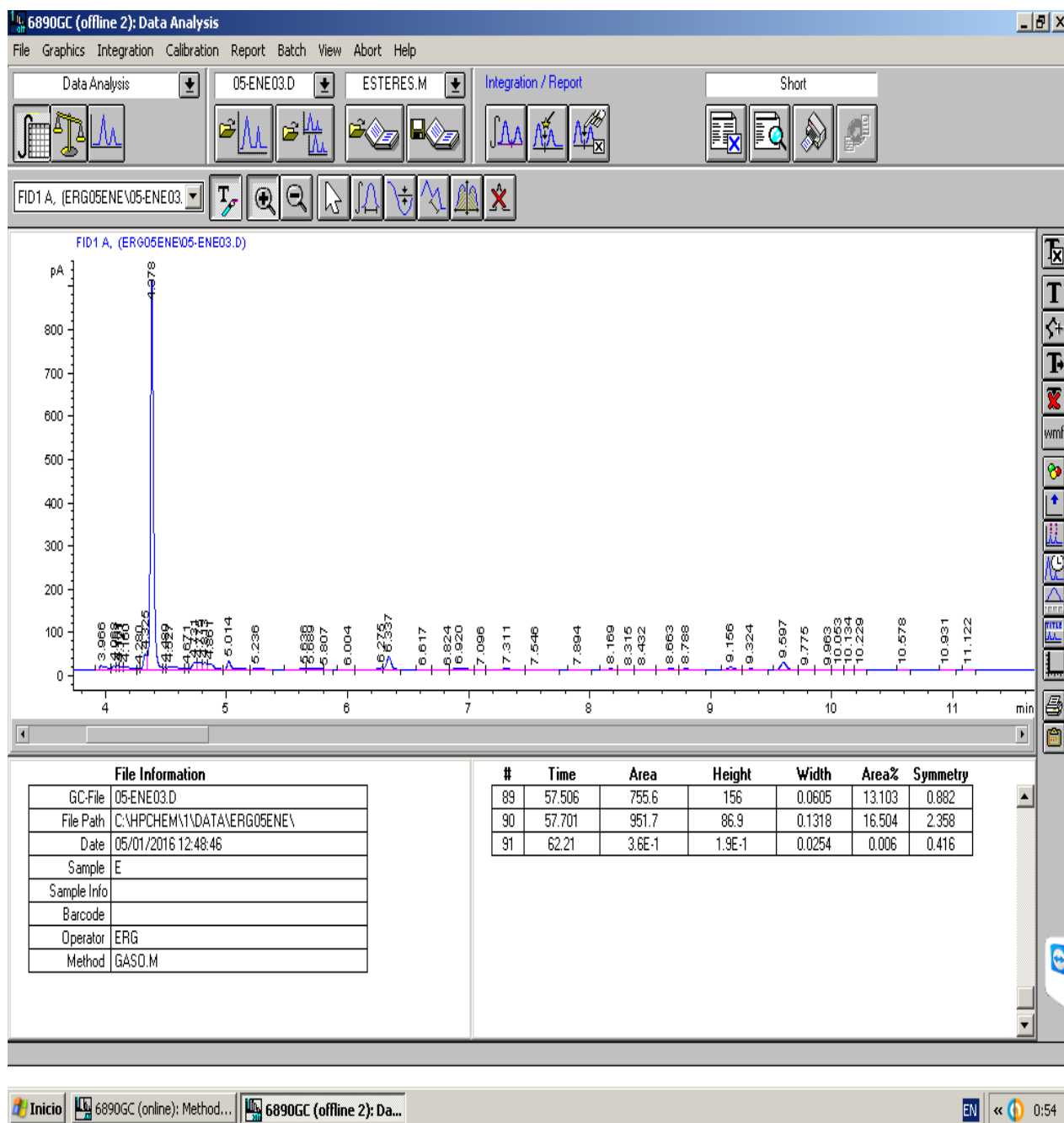
Figura 64. Cromatograma de muestreo del día 7 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y o-xileno.

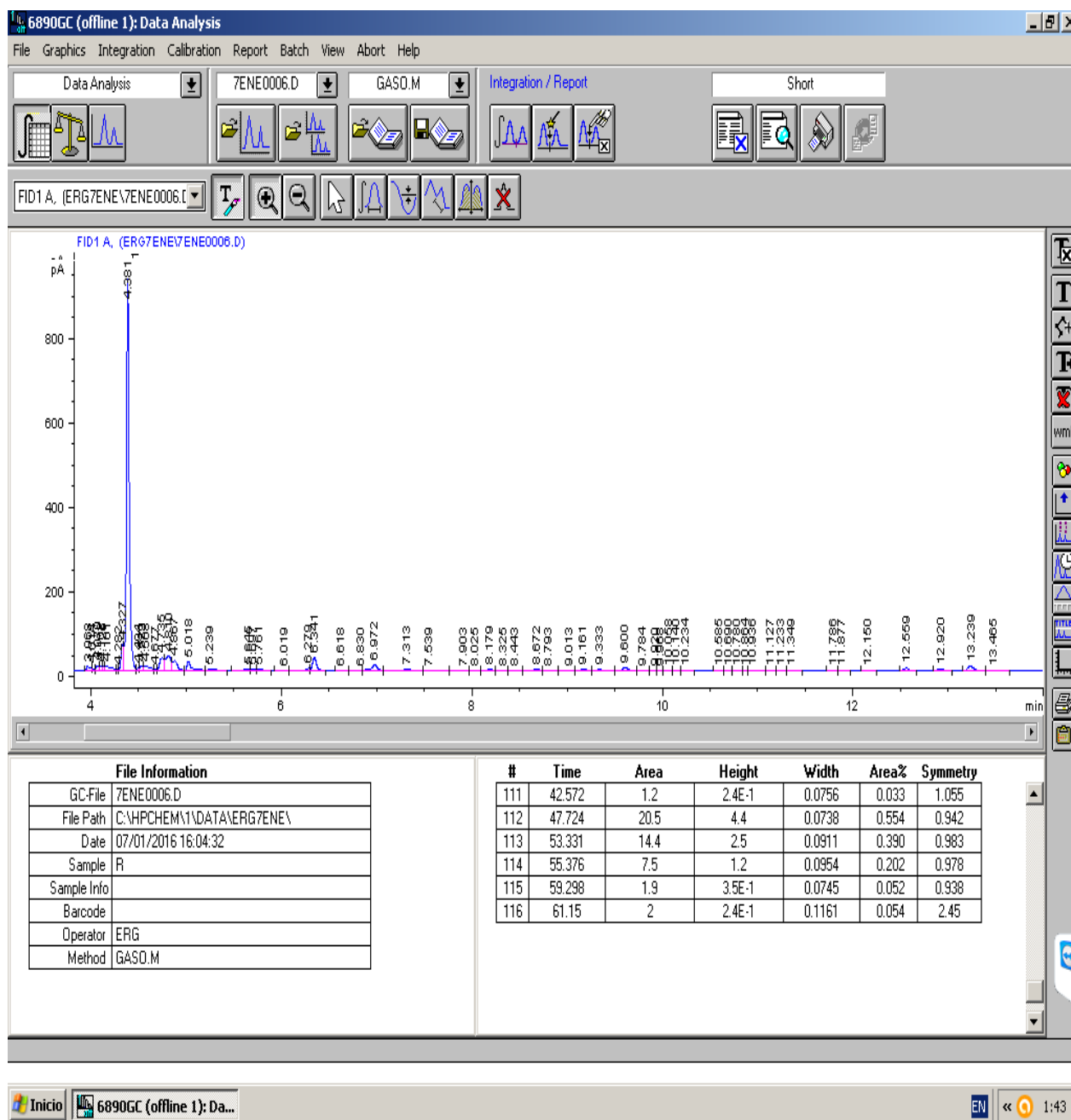
Figura 65. Cromatograma de muestreo del día 14 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

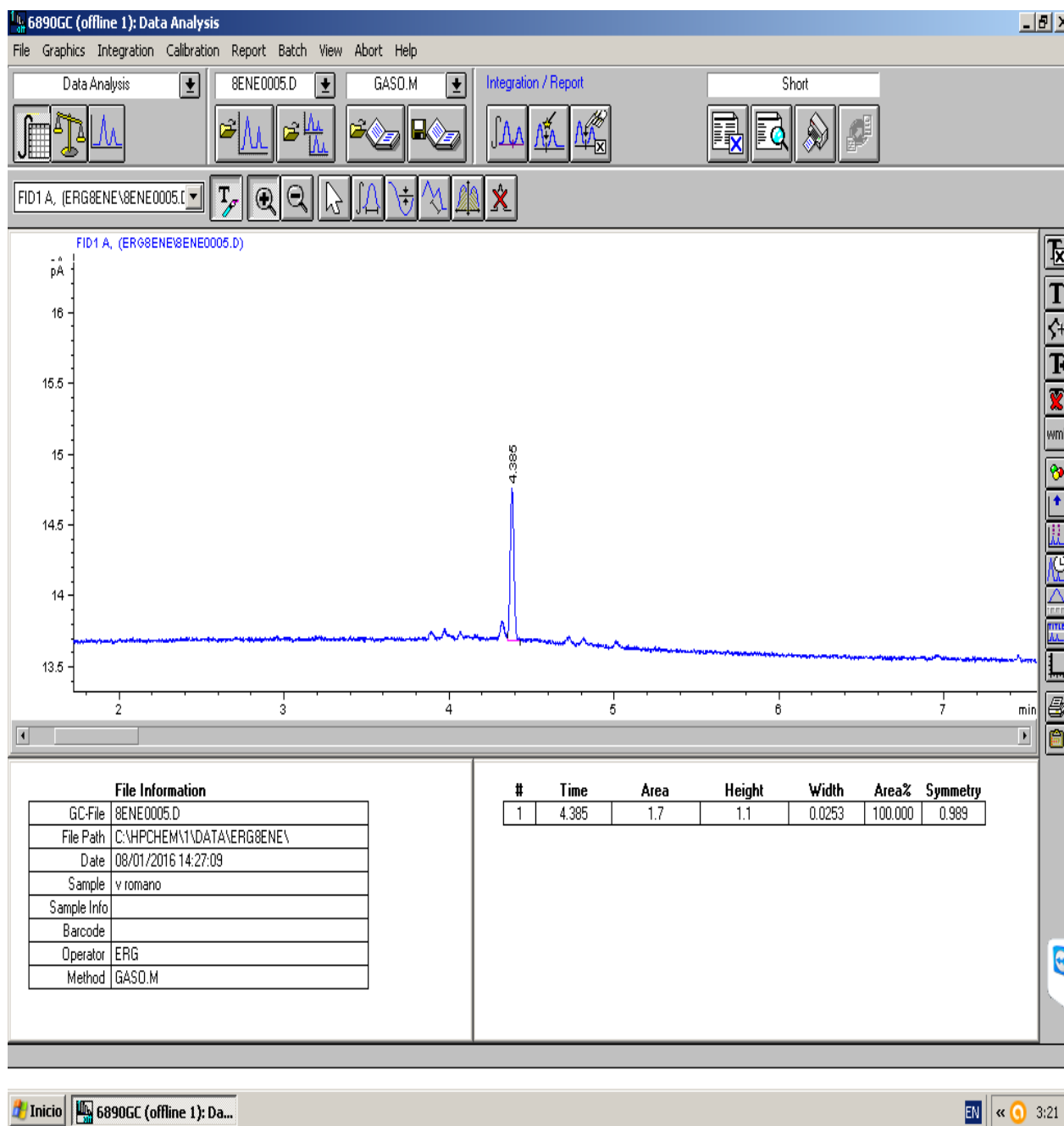
Figura 66. Cromatograma de muestreo del día 21 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno y p-xileno.

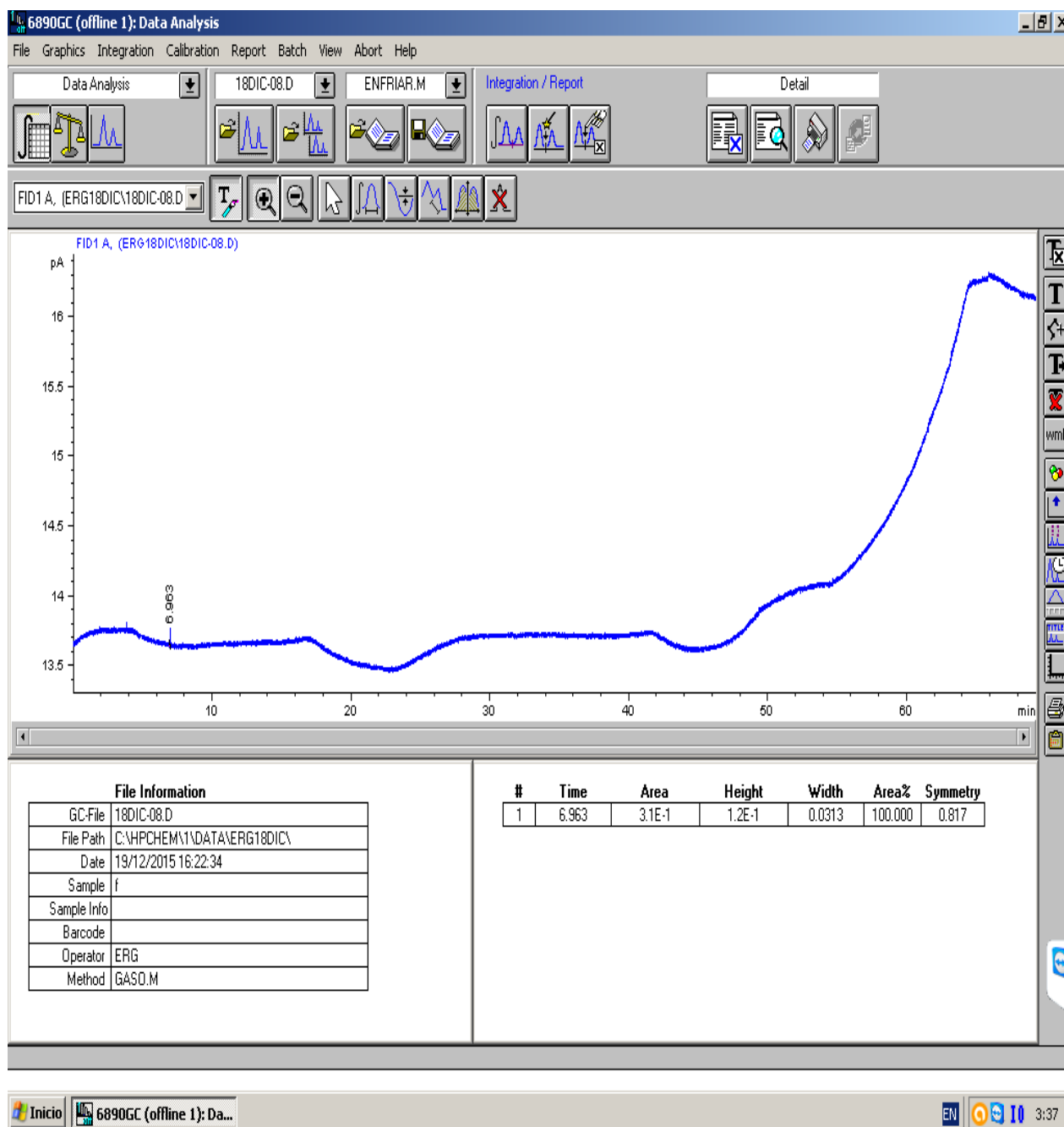
Figura 67. Cromatograma de muestreo del día 28 sin bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior no se identifican compuesto alguno que sea dañino.

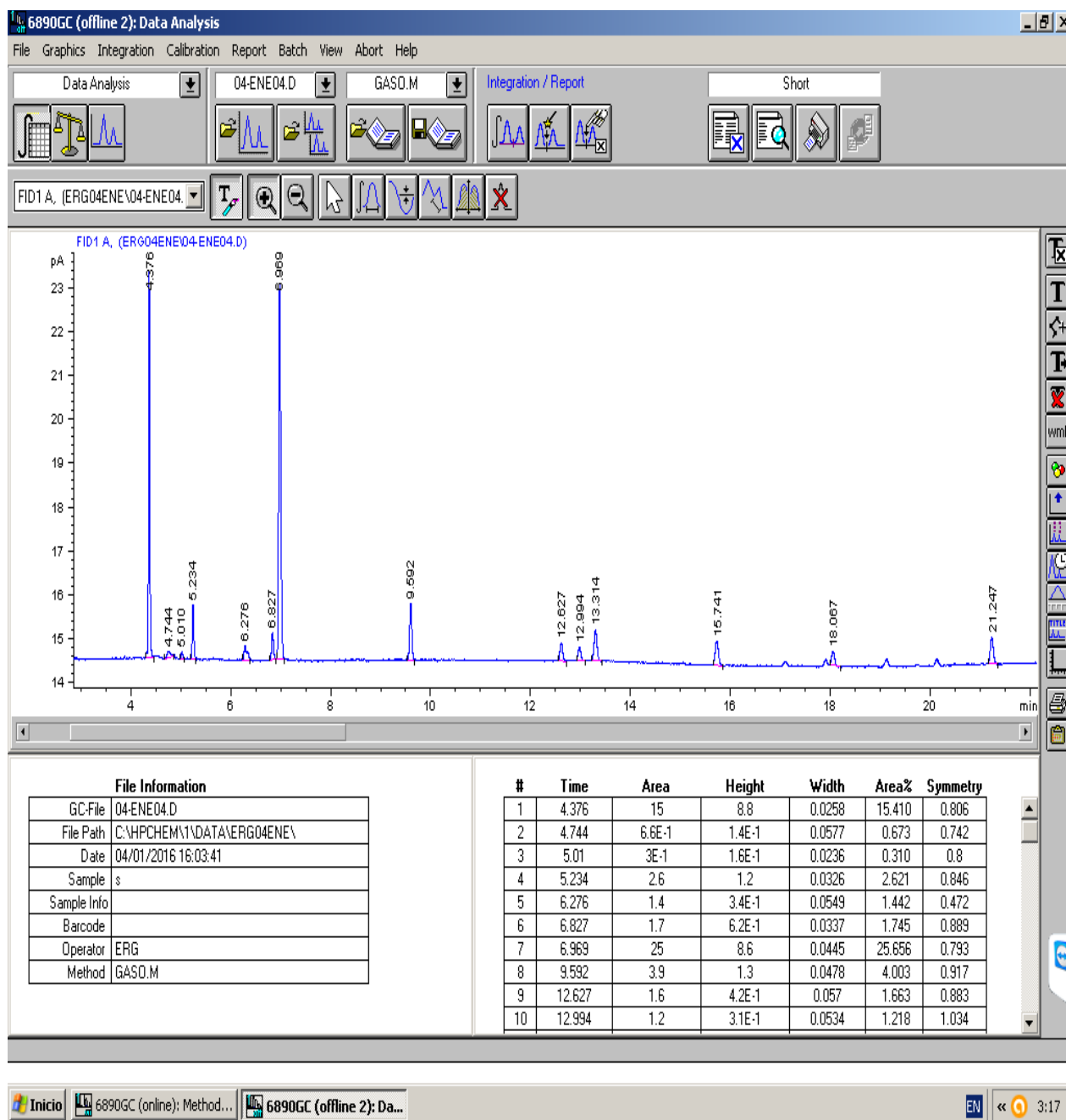
Figura 68. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

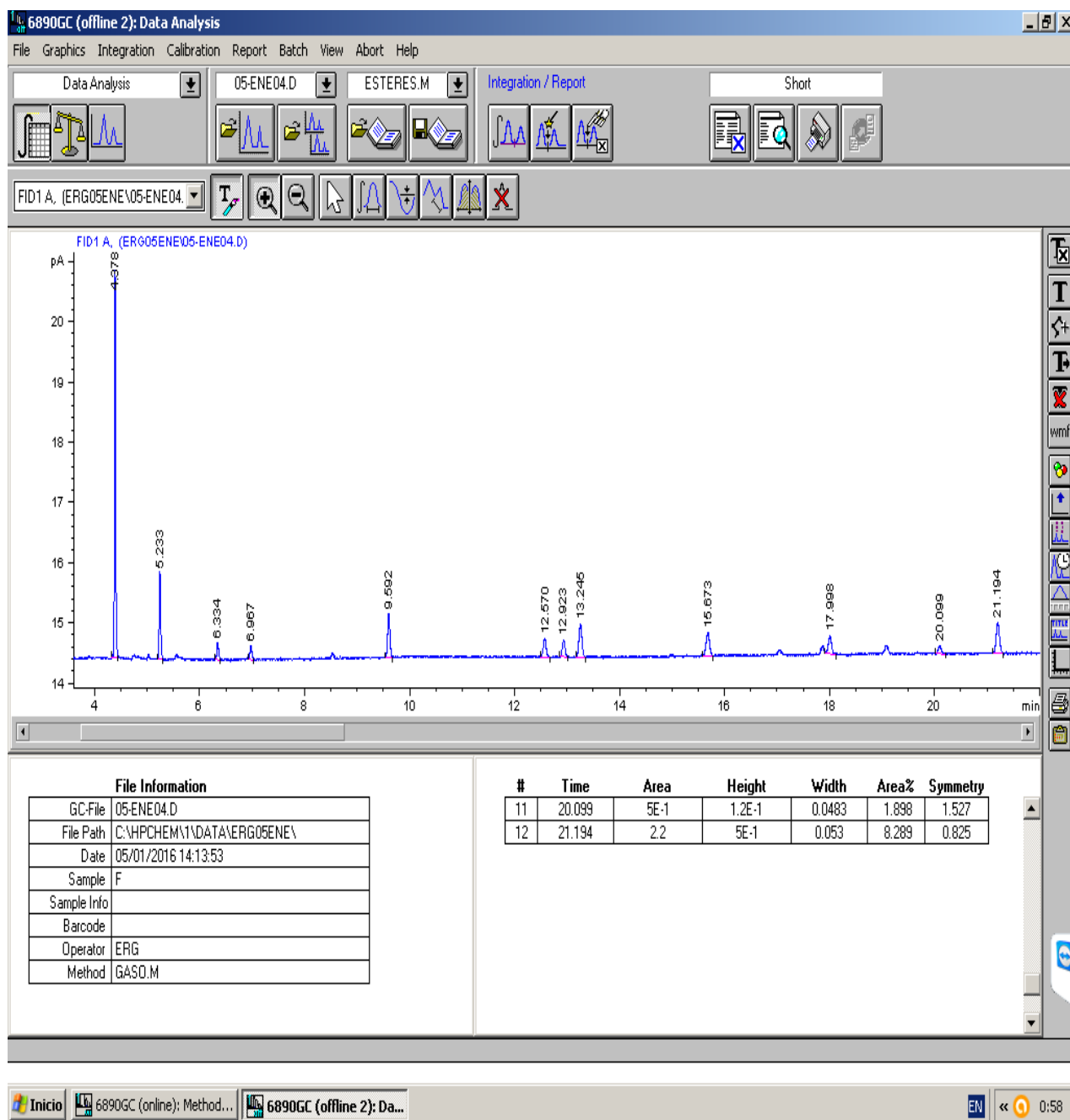
Figura 69. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

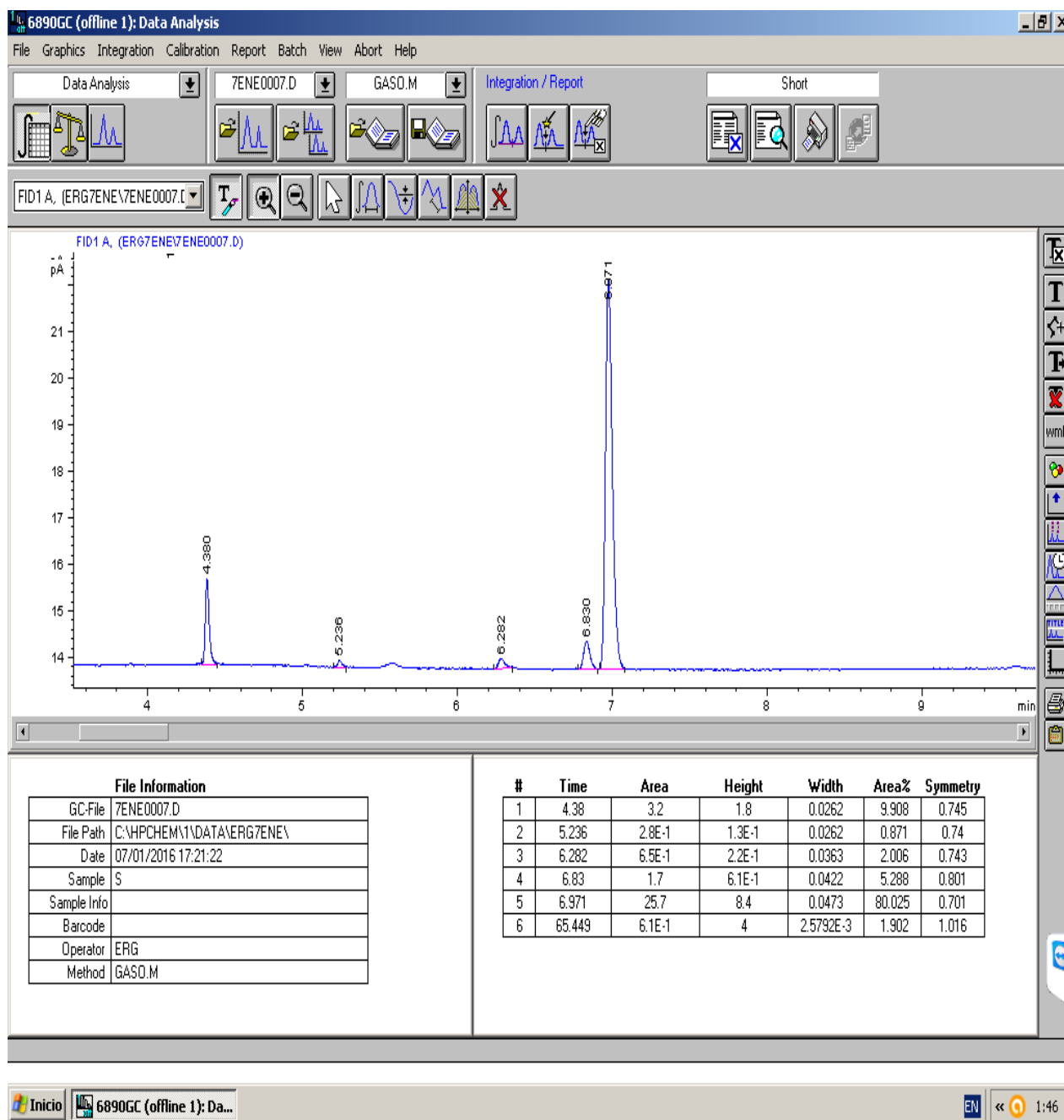
Figura 70. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos p y o.

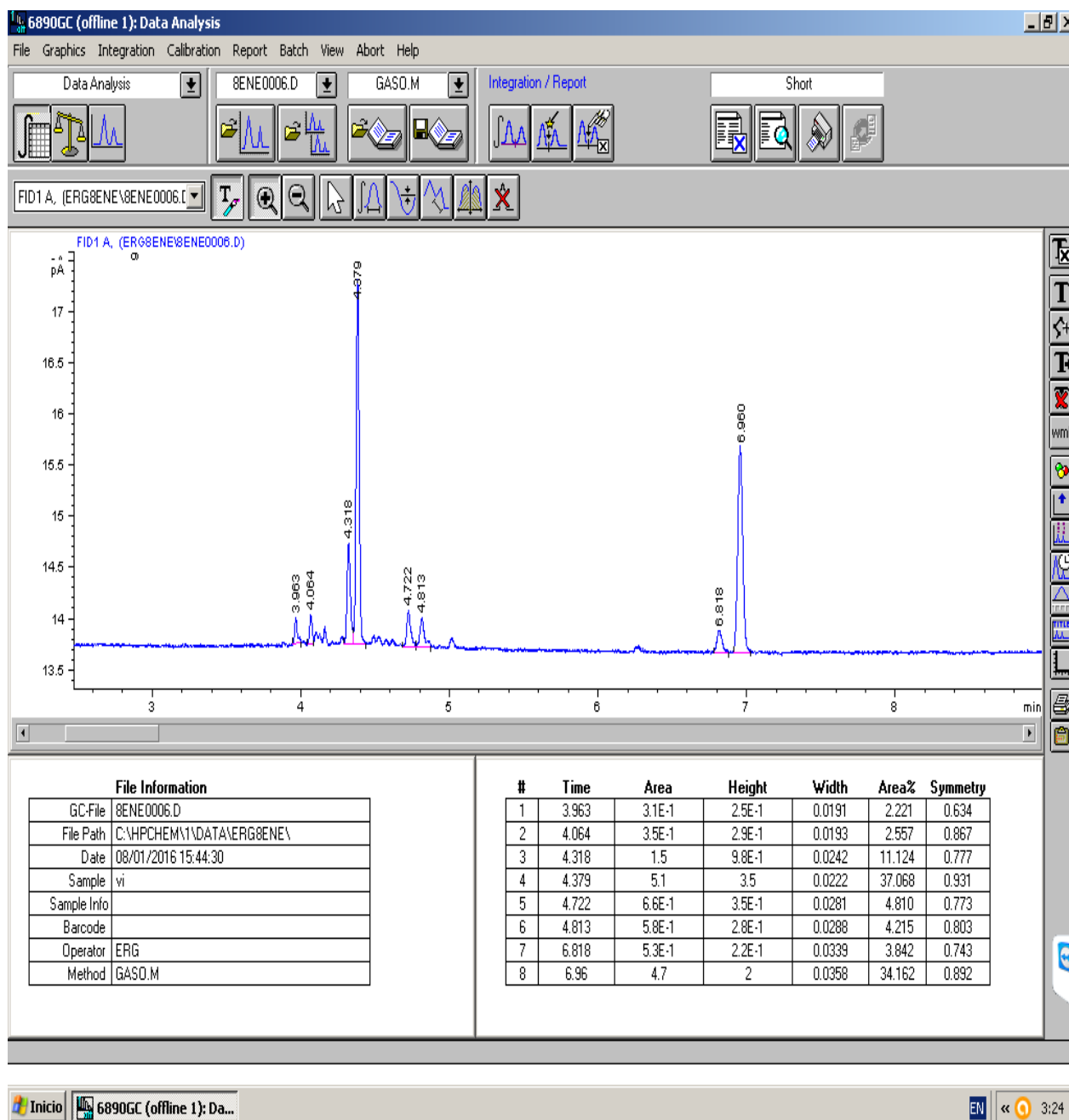
Figura 71. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

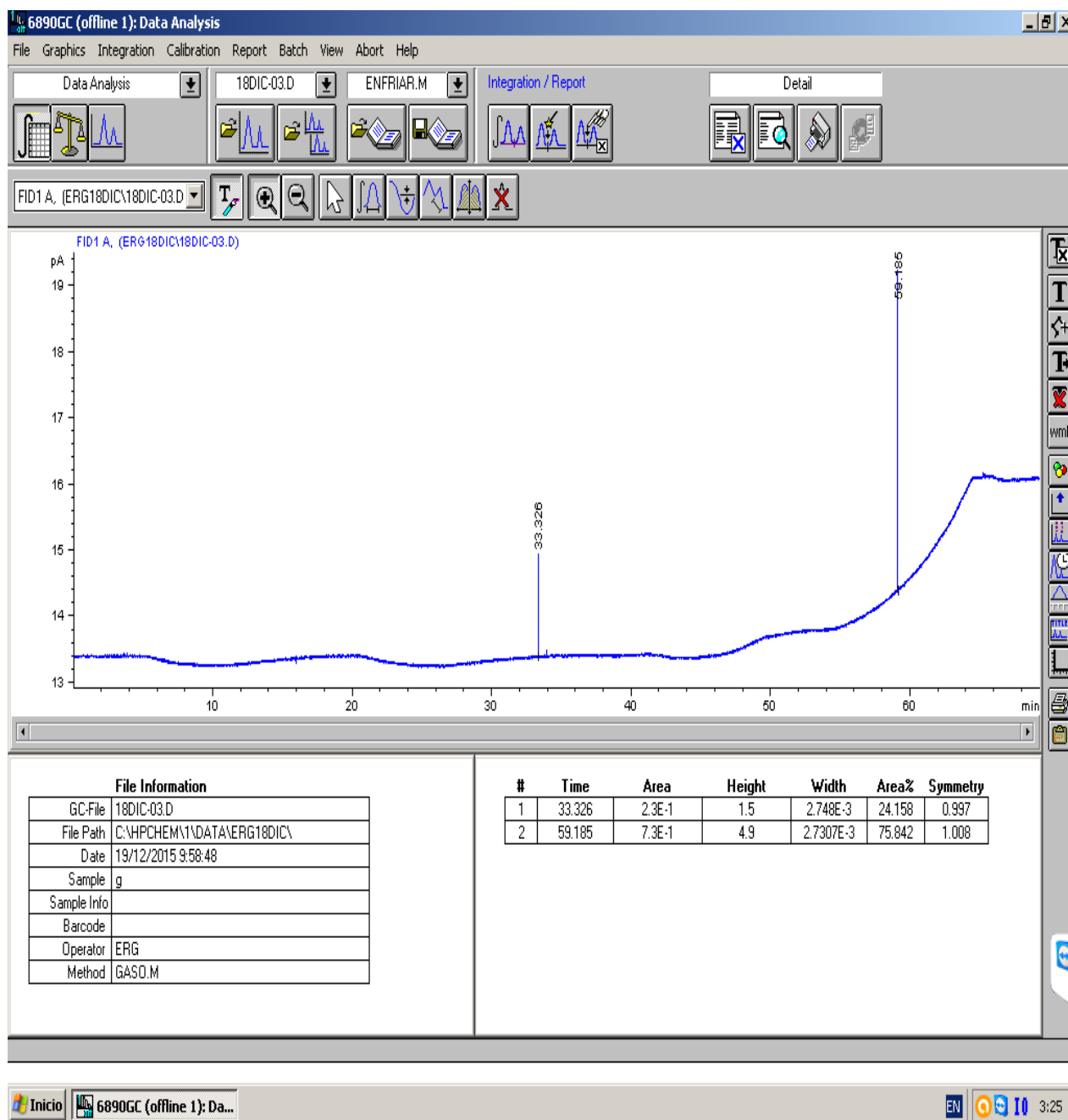
Figura 72. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 0% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

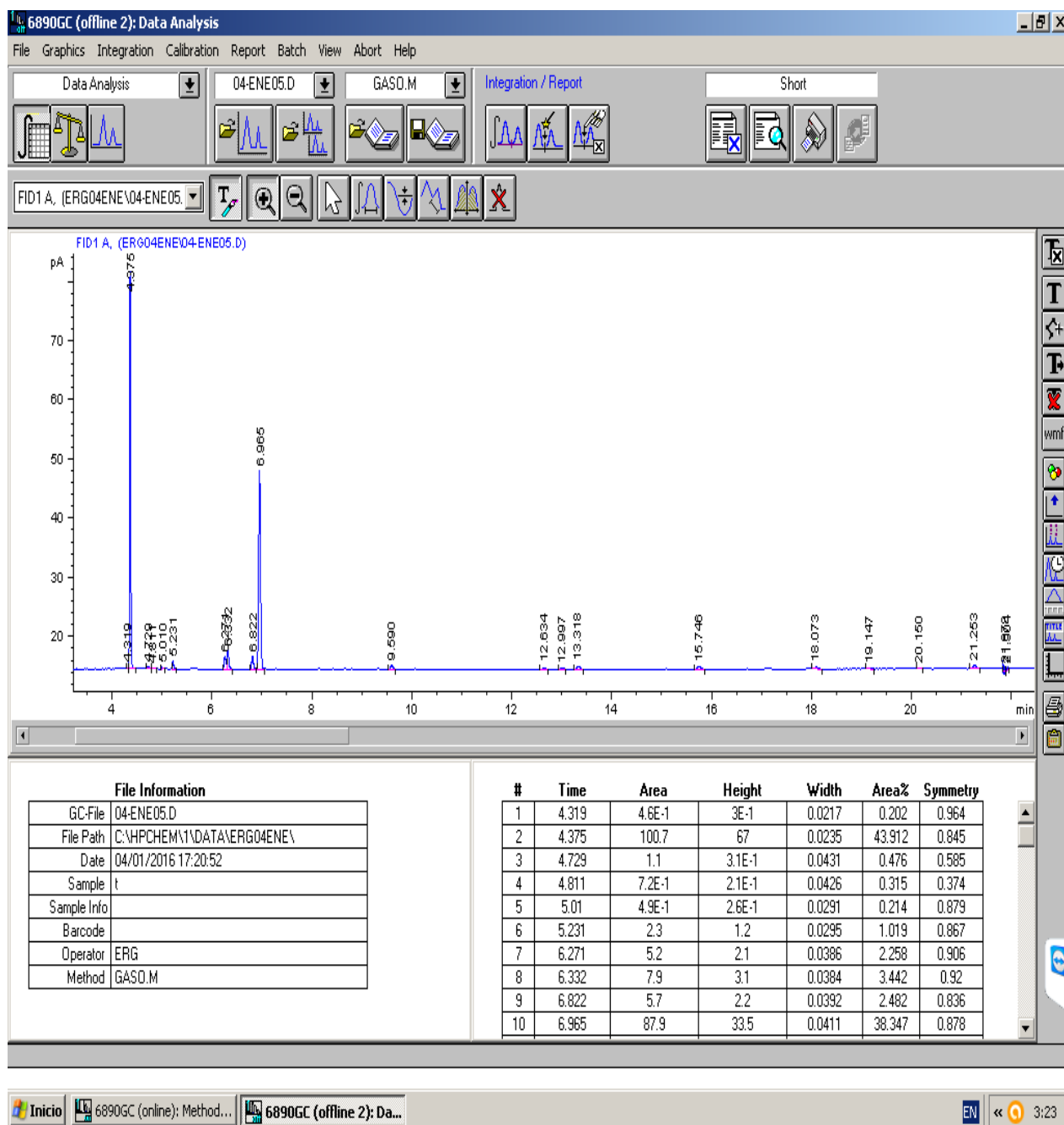
Figura 73. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior no se identifica algún compuesto que sea tóxico.

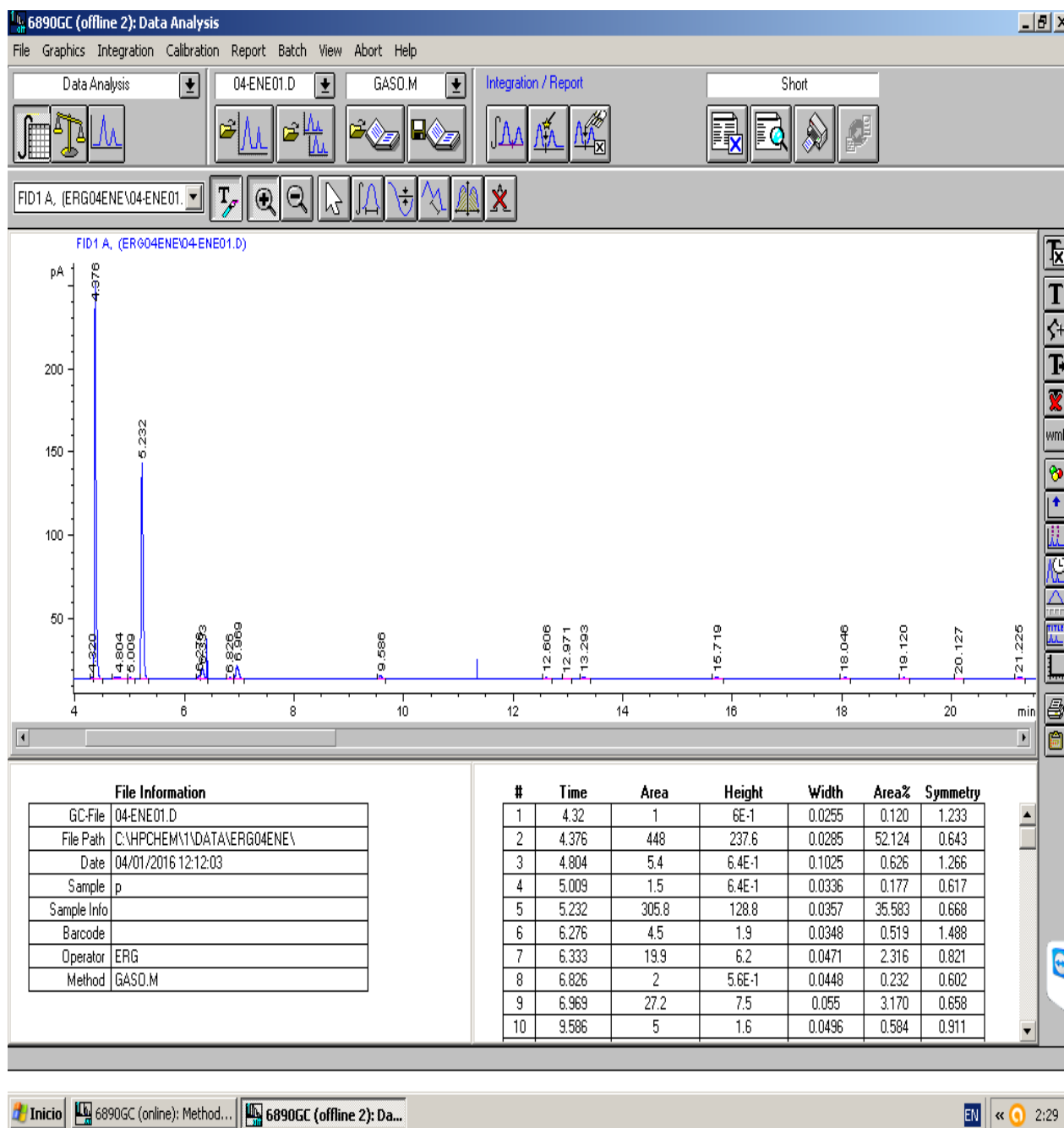
Figura 74. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

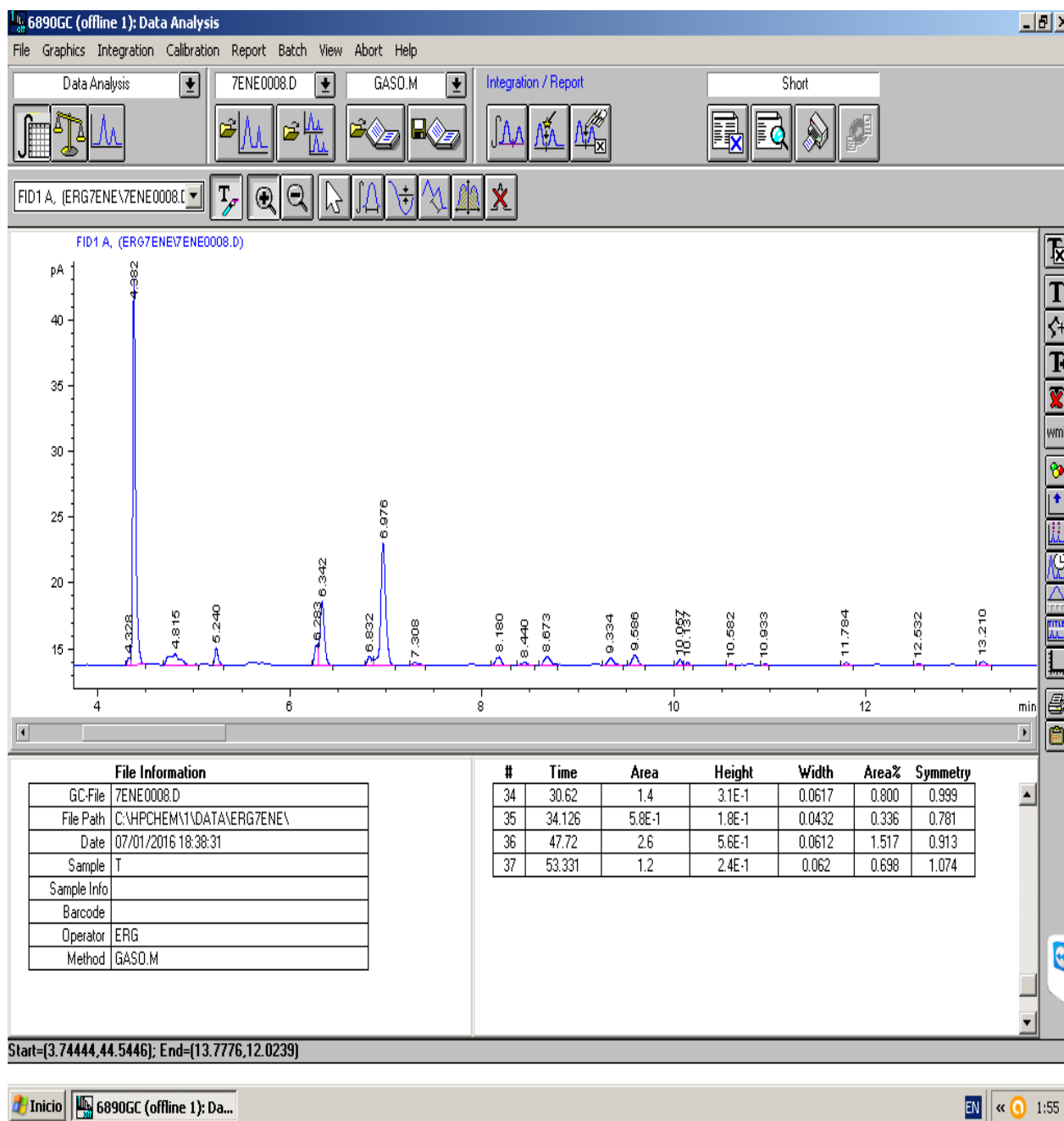
Figura 75. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

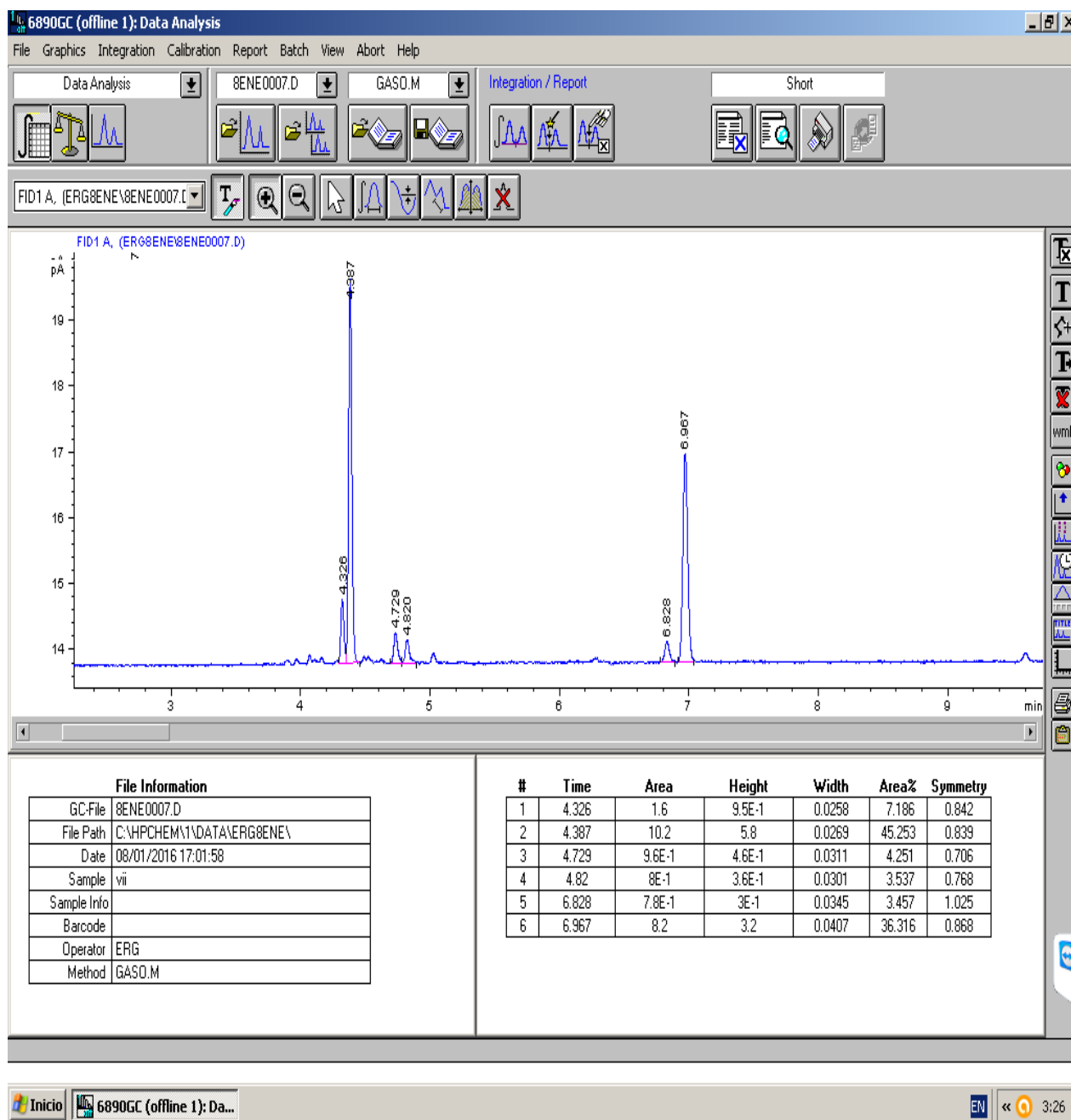
Figura 76. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y o-xileno.

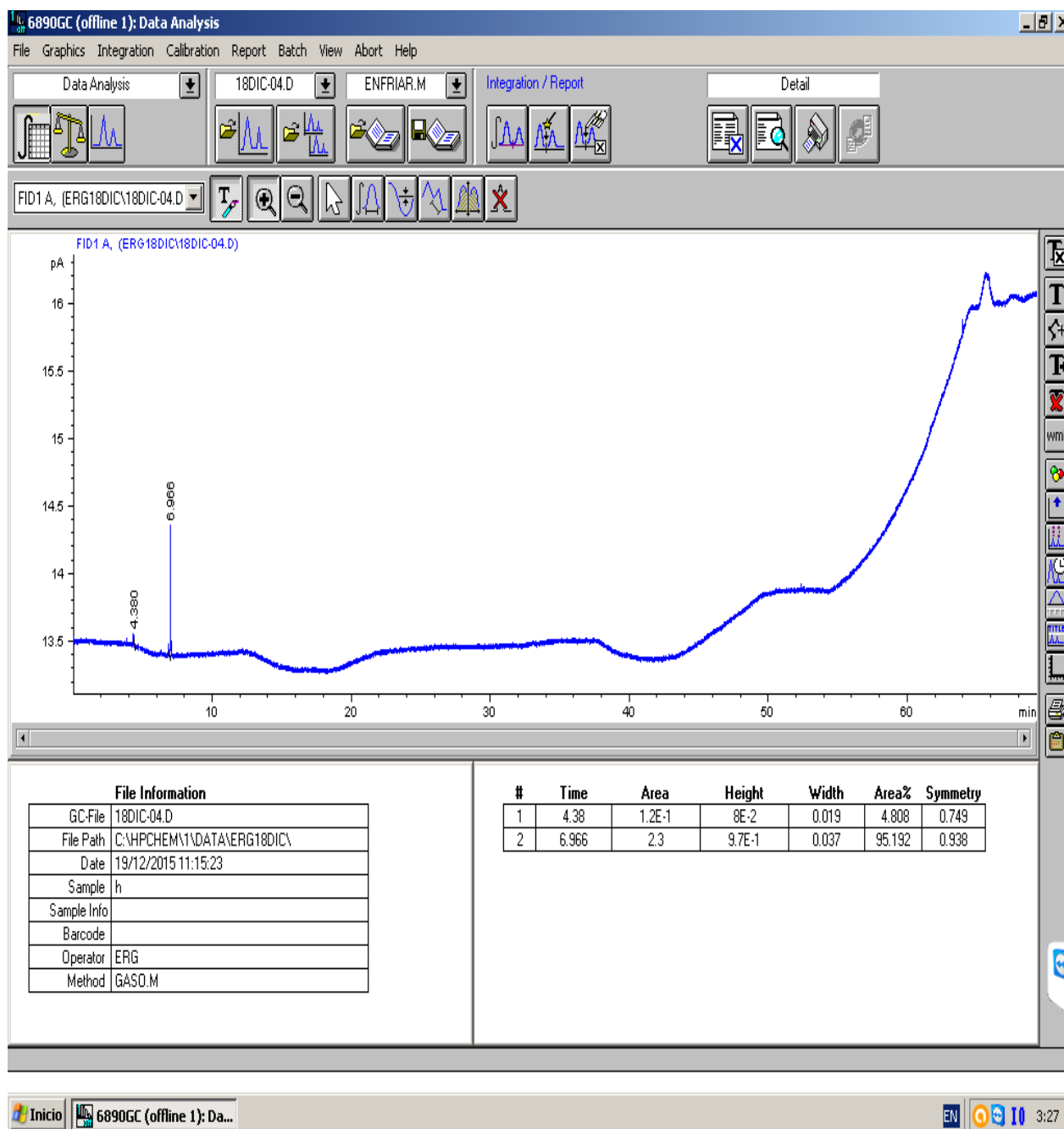
Figura 77. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

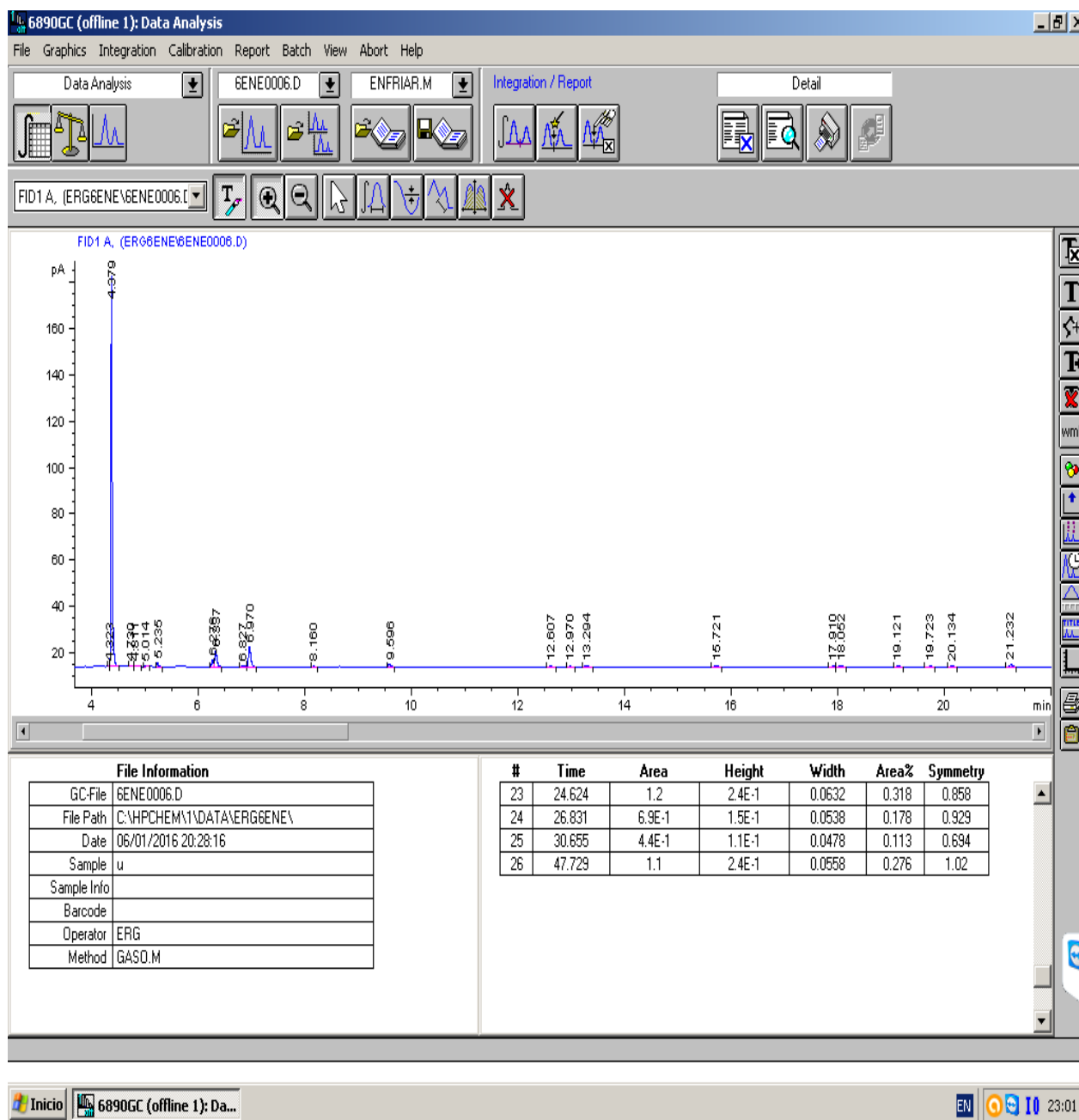
Figura 78. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno únicamente.

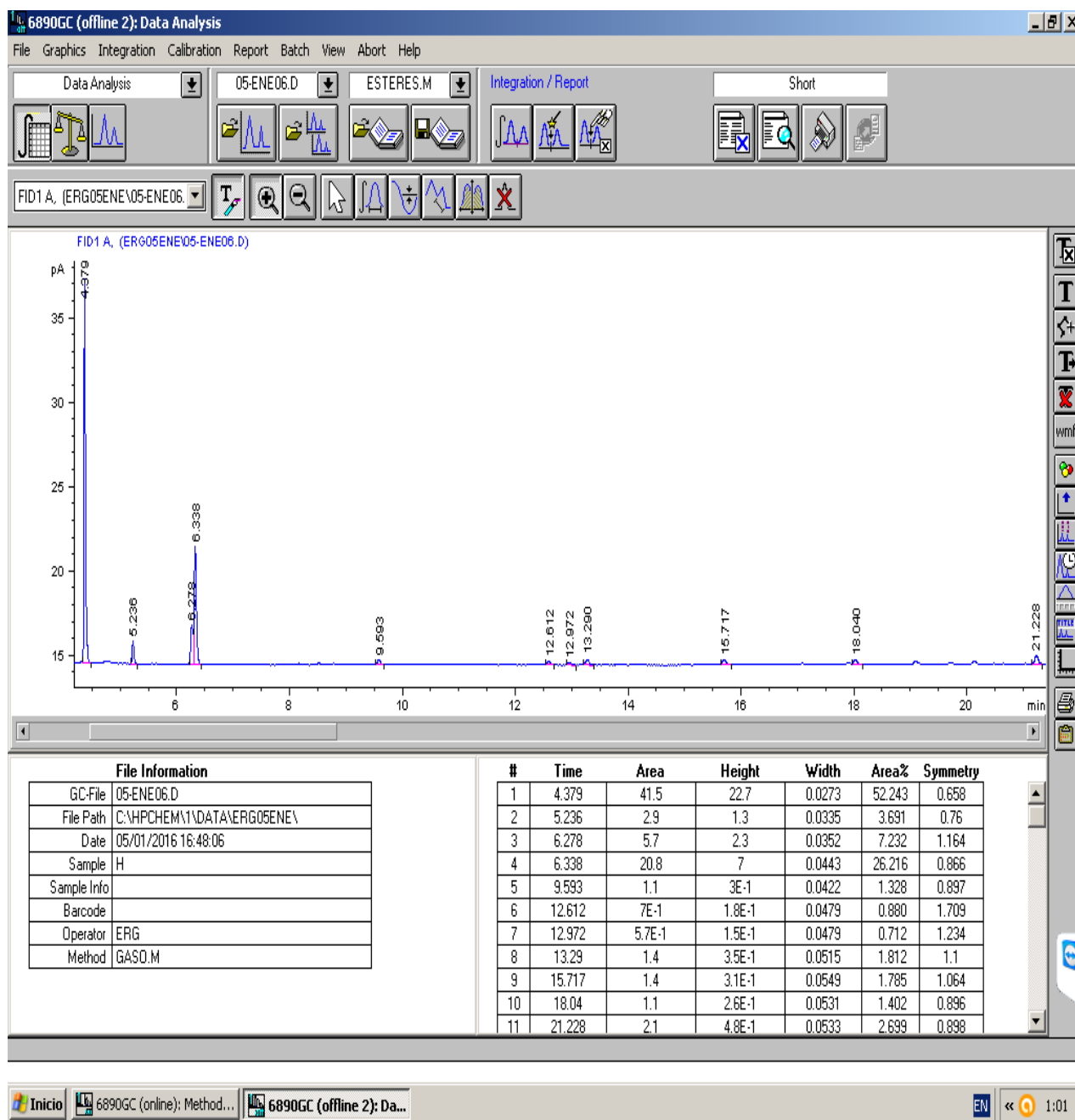
Figura 79. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

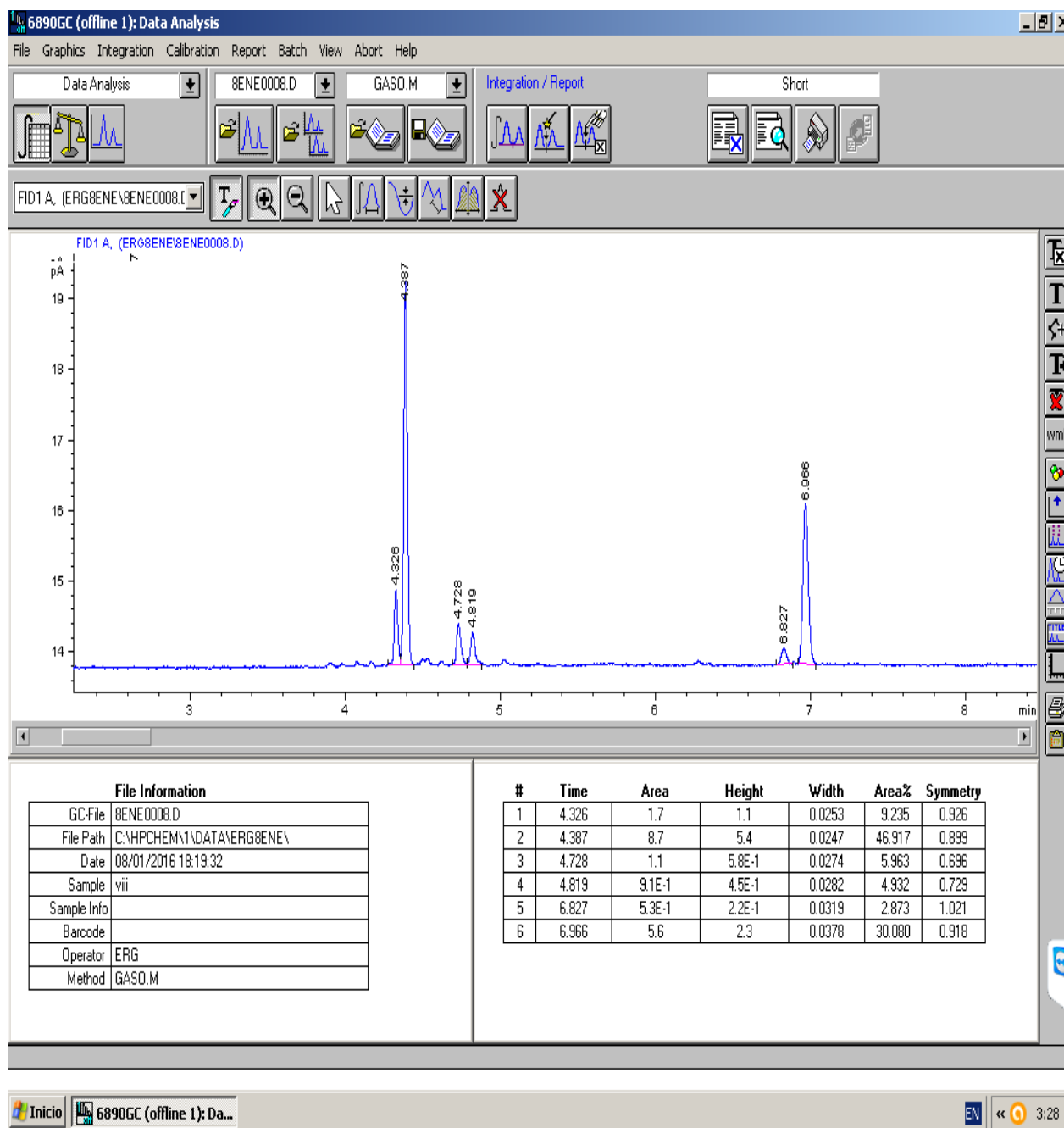
Figura 80. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno y los xilenos m, p y o.

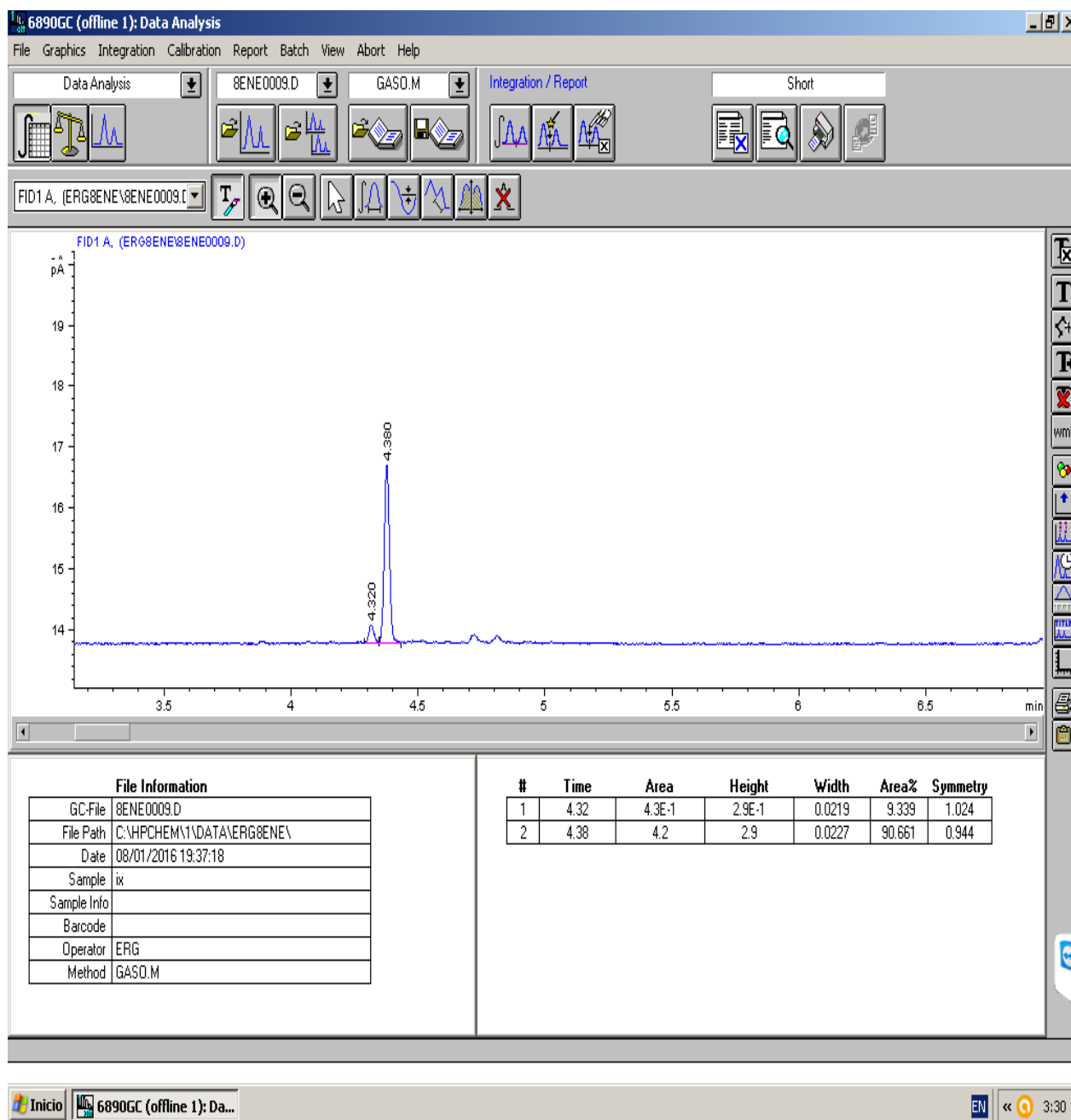
Figura 81. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno únicamente.

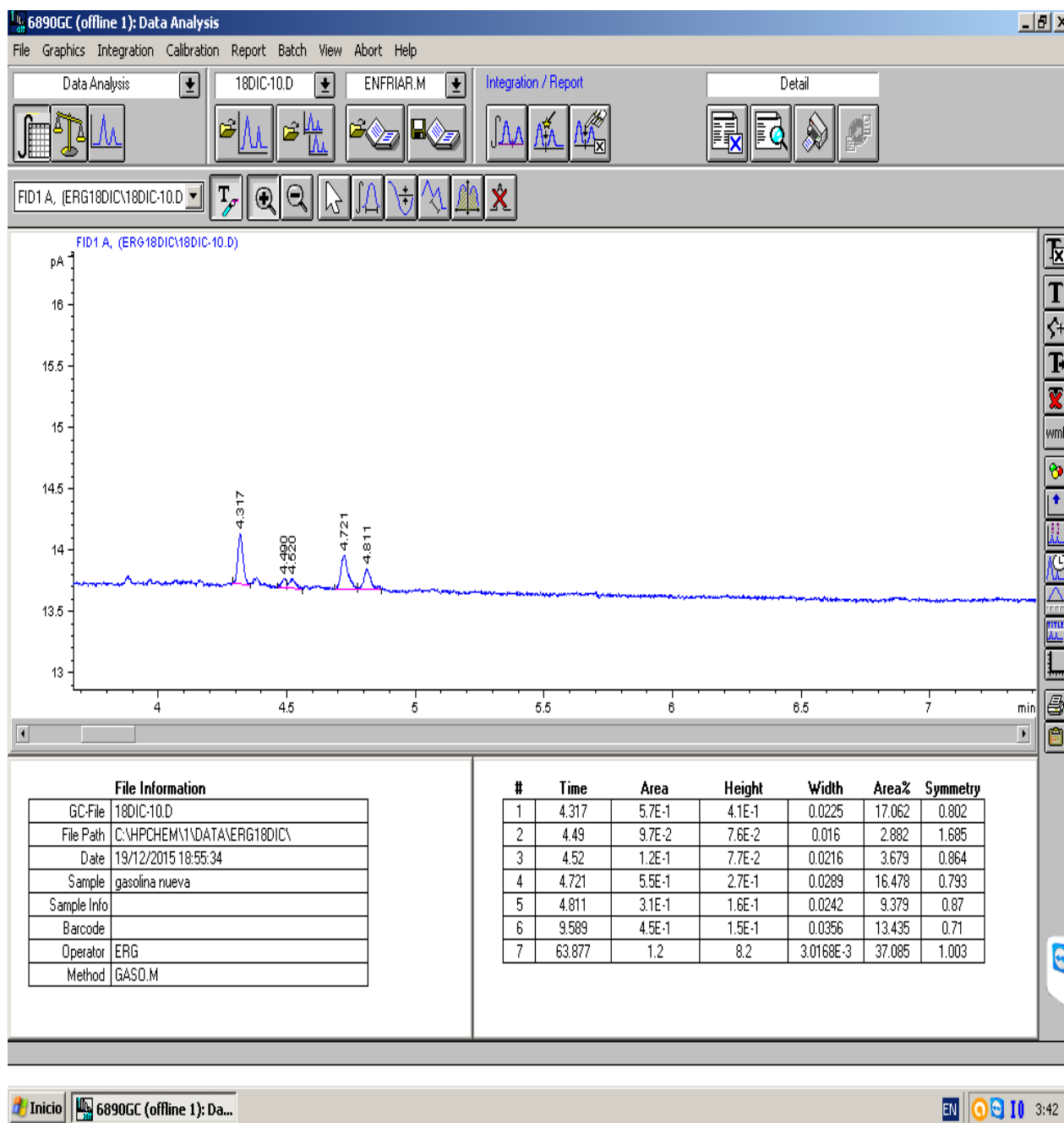
Figura 82. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior no se identifica algún compuesto que sea tóxico.

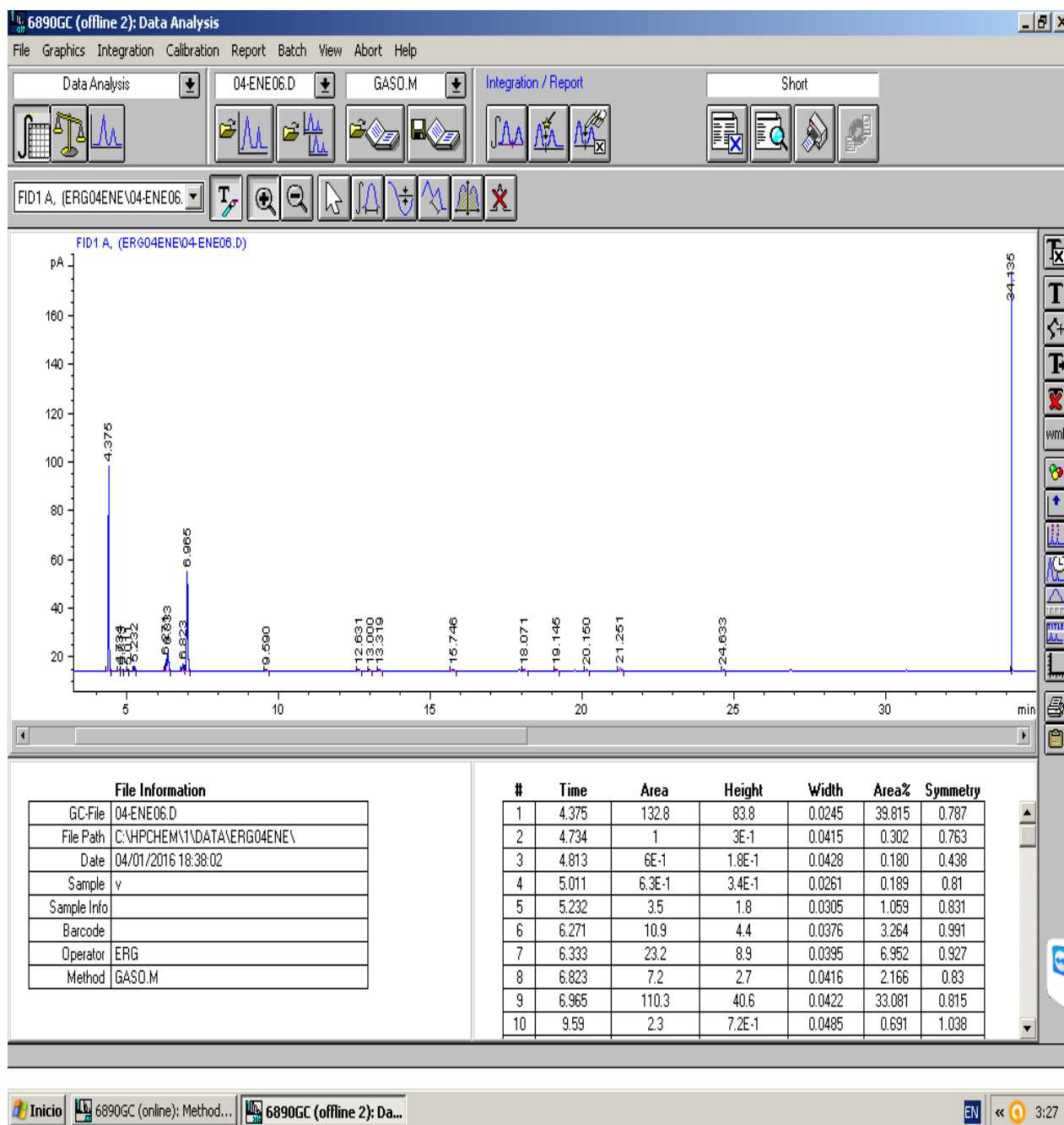
Figura 83. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano y tolueno.

Figura 84. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

6890GC (offline 2): Data Analysis

File Graphics Integration Calibration Report Batch View Abort Help

Data Analysis | 05-ENE07.D | ESTERES.M | Integration / Report | Short

FID1 A, (ERG05ENE\05-ENE07.D)

Chromatogram showing a large peak at 3.78 minutes and several smaller peaks between 4 and 13 minutes. The y-axis is pA (0 to 500) and the x-axis is minutes (4 to 13).

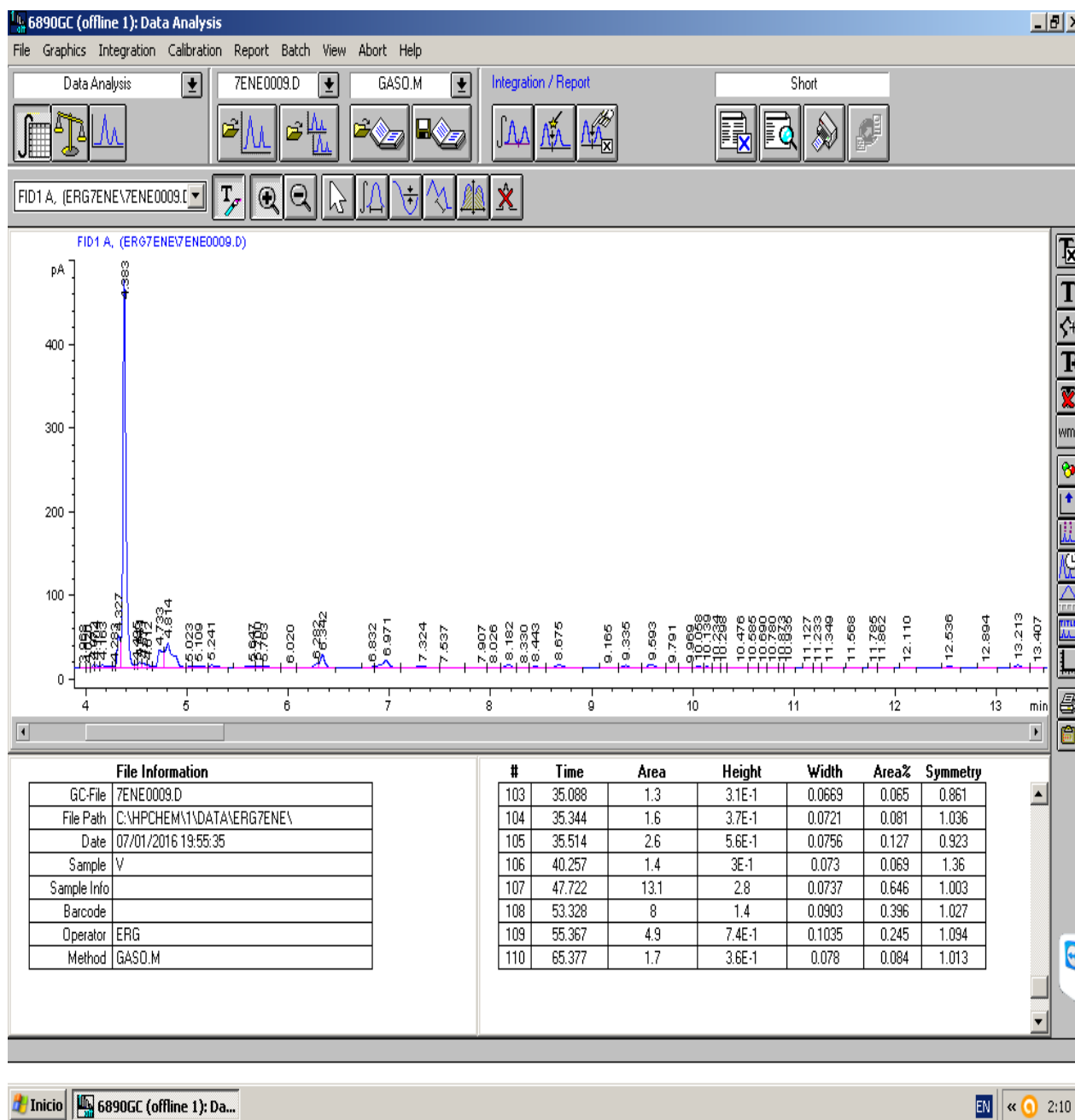
| # | Time | Area | Height | Width | Area% | Symmetry |
|-----|--------|------|--------|--------|-------|----------|
| 100 | 34.016 | 3 | 6.9E-1 | 0.0692 | 0.128 | 1.07 |
| 101 | 34.159 | 5.7 | 1.4 | 0.0657 | 0.246 | 1.022 |
| 102 | 34.305 | 1.3 | 2.5E-1 | 0.0758 | 0.055 | 0.63 |
| 103 | 35.118 | 1.1 | 2.5E-1 | 0.0625 | 0.046 | 0.933 |
| 104 | 35.371 | 1.4 | 3.1E-1 | 0.0747 | 0.062 | 1.031 |
| 105 | 35.541 | 2.4 | 5.1E-1 | 0.0713 | 0.101 | 1.081 |
| 106 | 40.277 | 1.2 | 2.5E-1 | 0.0753 | 0.053 | 1.069 |
| 107 | 47.729 | 9.2 | 2 | 0.0724 | 0.396 | 0.996 |
| 108 | 53.334 | 5.3 | 9.4E-1 | 0.0863 | 0.228 | 0.99 |
| 109 | 55.38 | 2.9 | 4.8E-1 | 0.0839 | 0.123 | 1.145 |

File Information

| | |
|-------------|------------------------------|
| GC-File | 05-ENE07.D |
| File Path | C:\VHP\CHEM\1\DATA\ERG05ENE\ |
| Date | 05/01/2016 18:05:19 |
| Sample | I |
| Sample Info | |
| Barcode | |
| Operator | ERG |
| Method | GAS0.M |

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

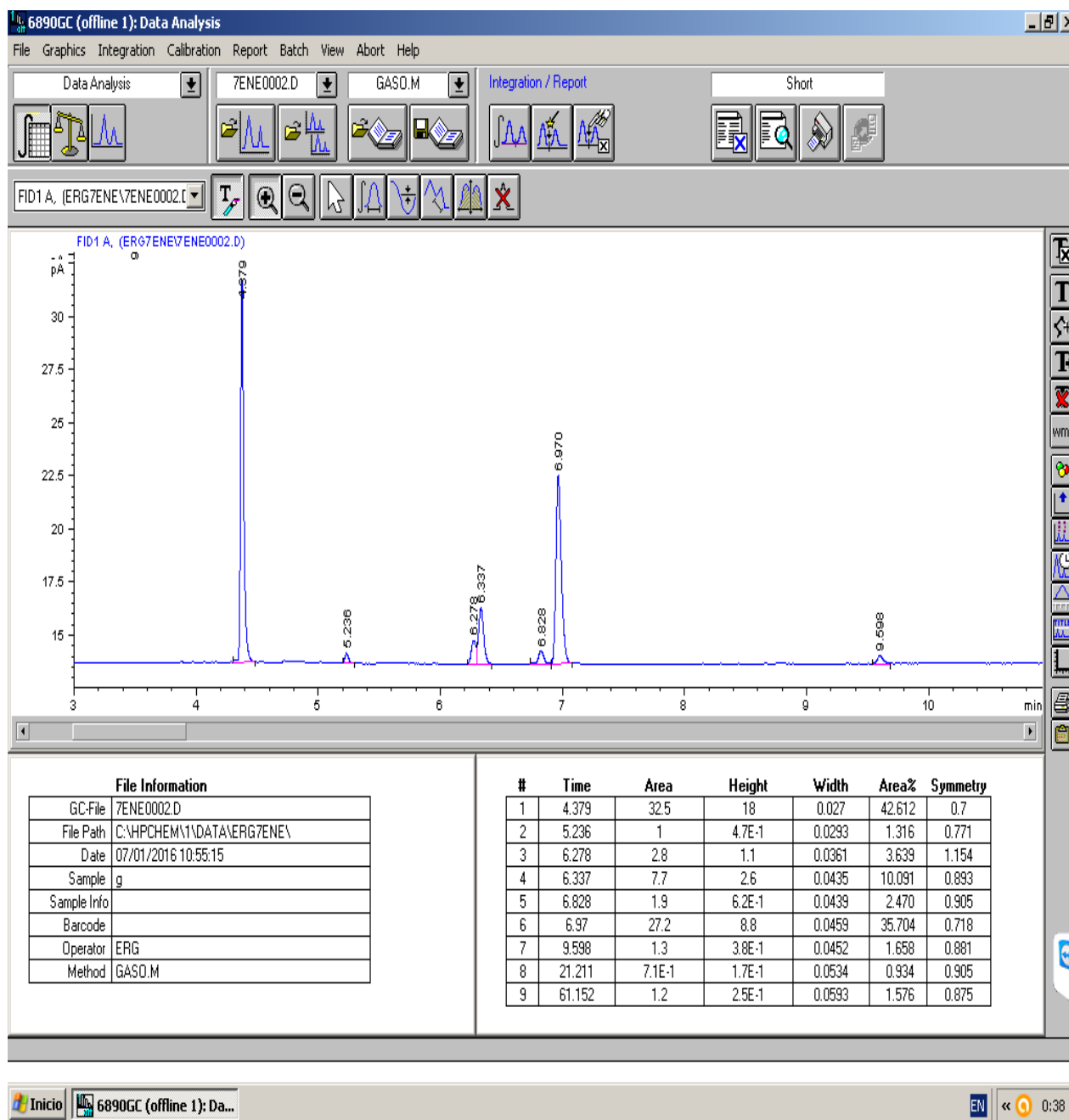
Figura 86. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y o-xileno.

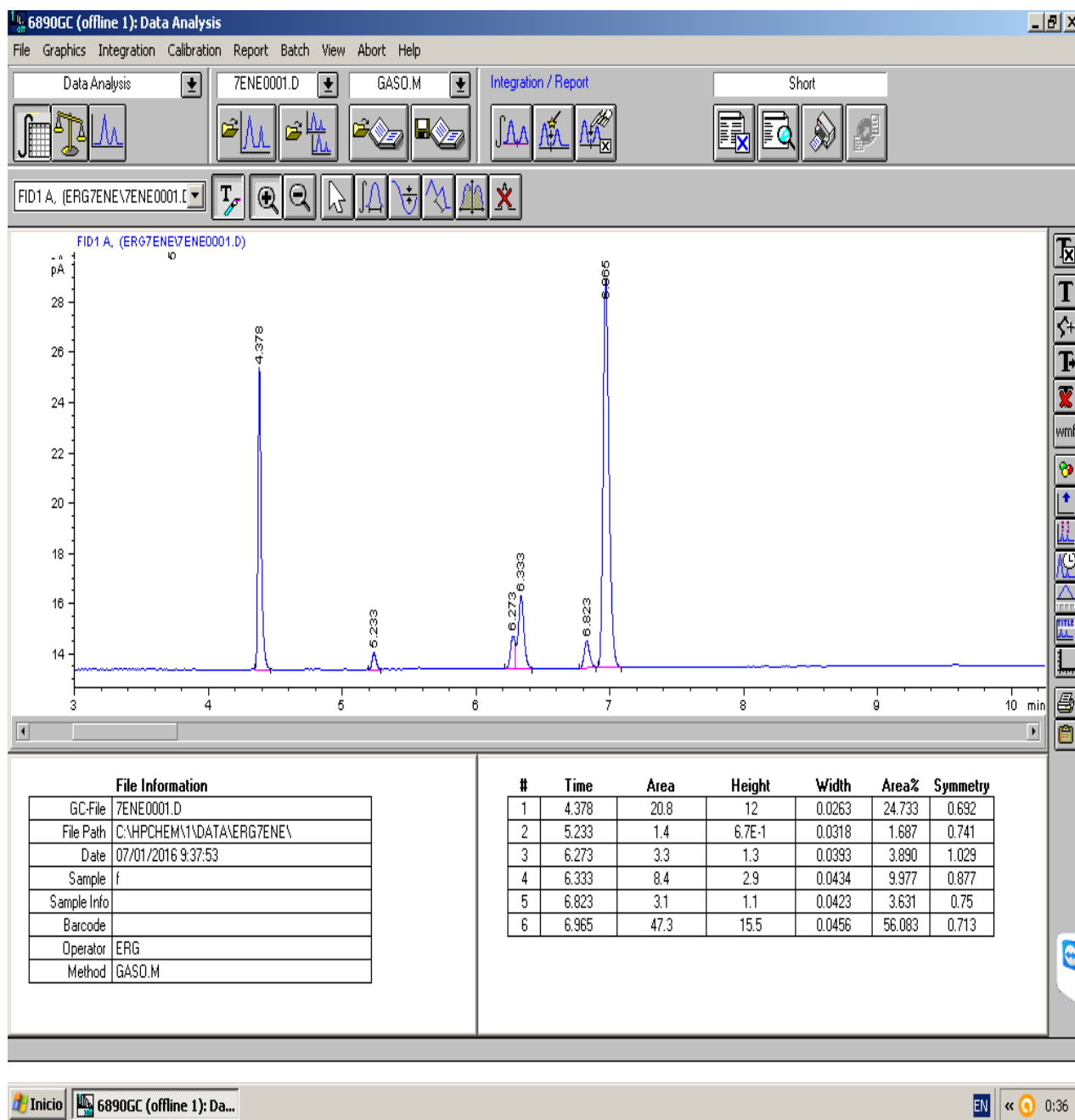
Figura 87. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno y tolueno.

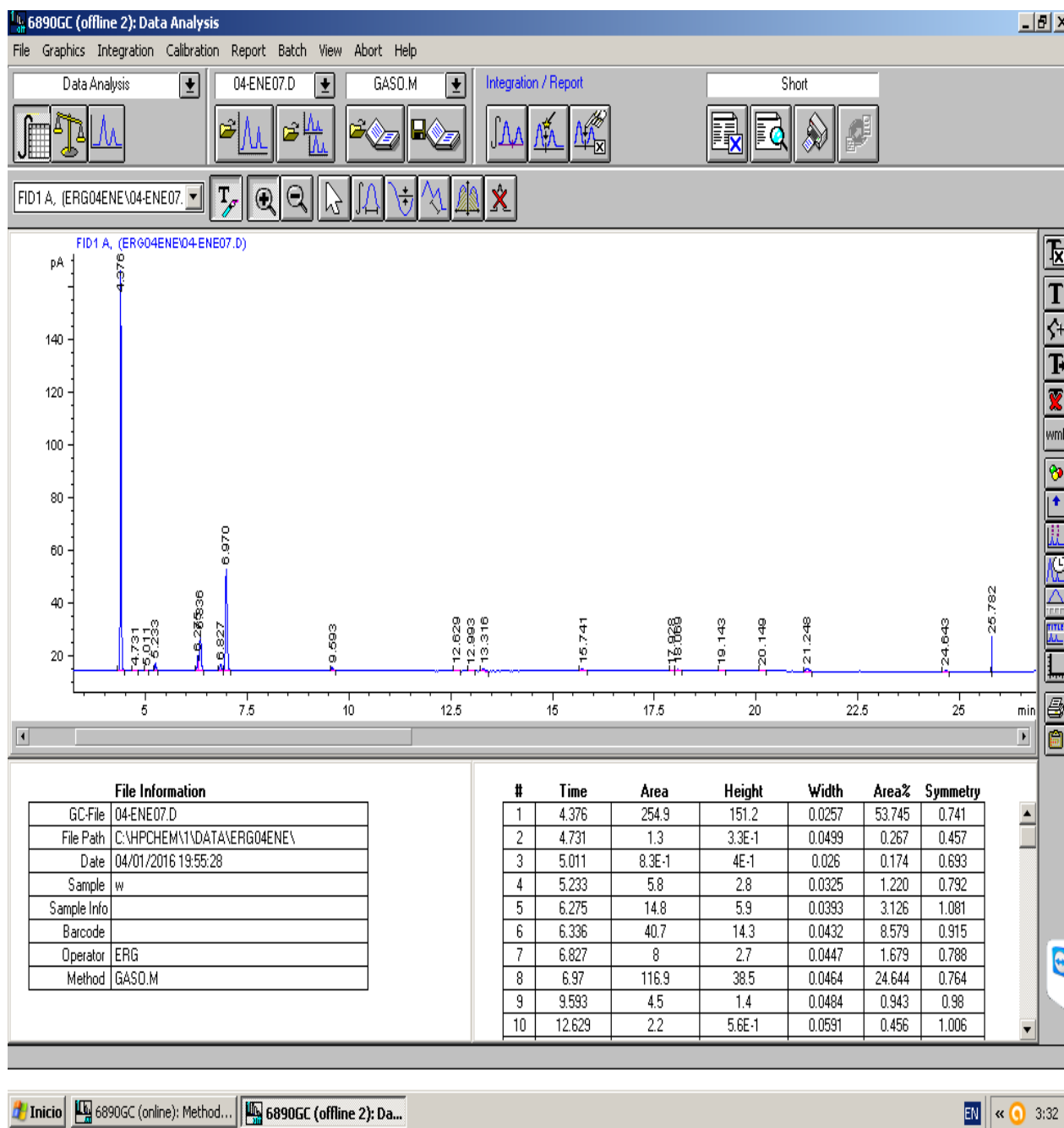
Figura 88. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

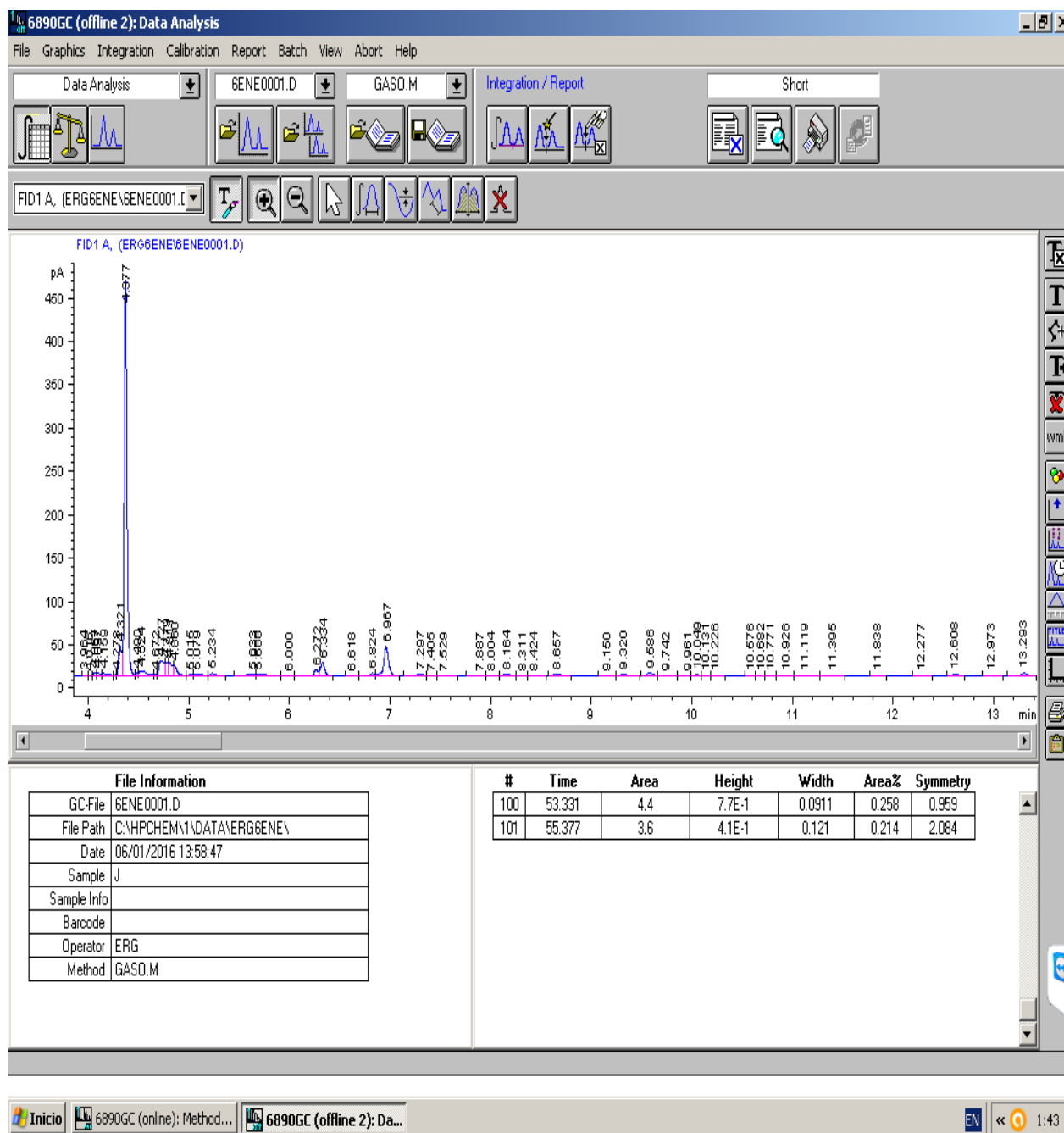
Figura 89. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

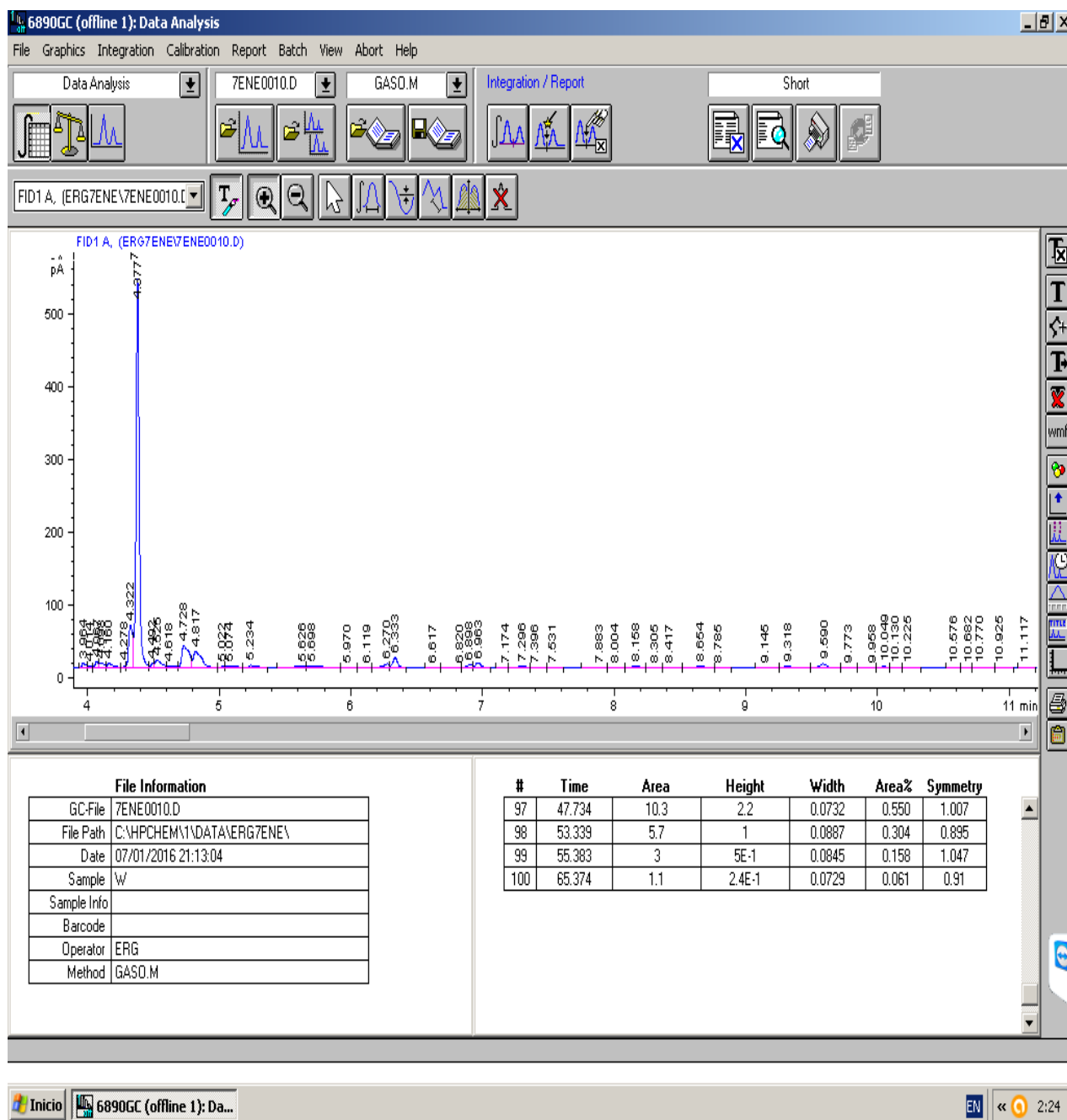
Figura 90. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

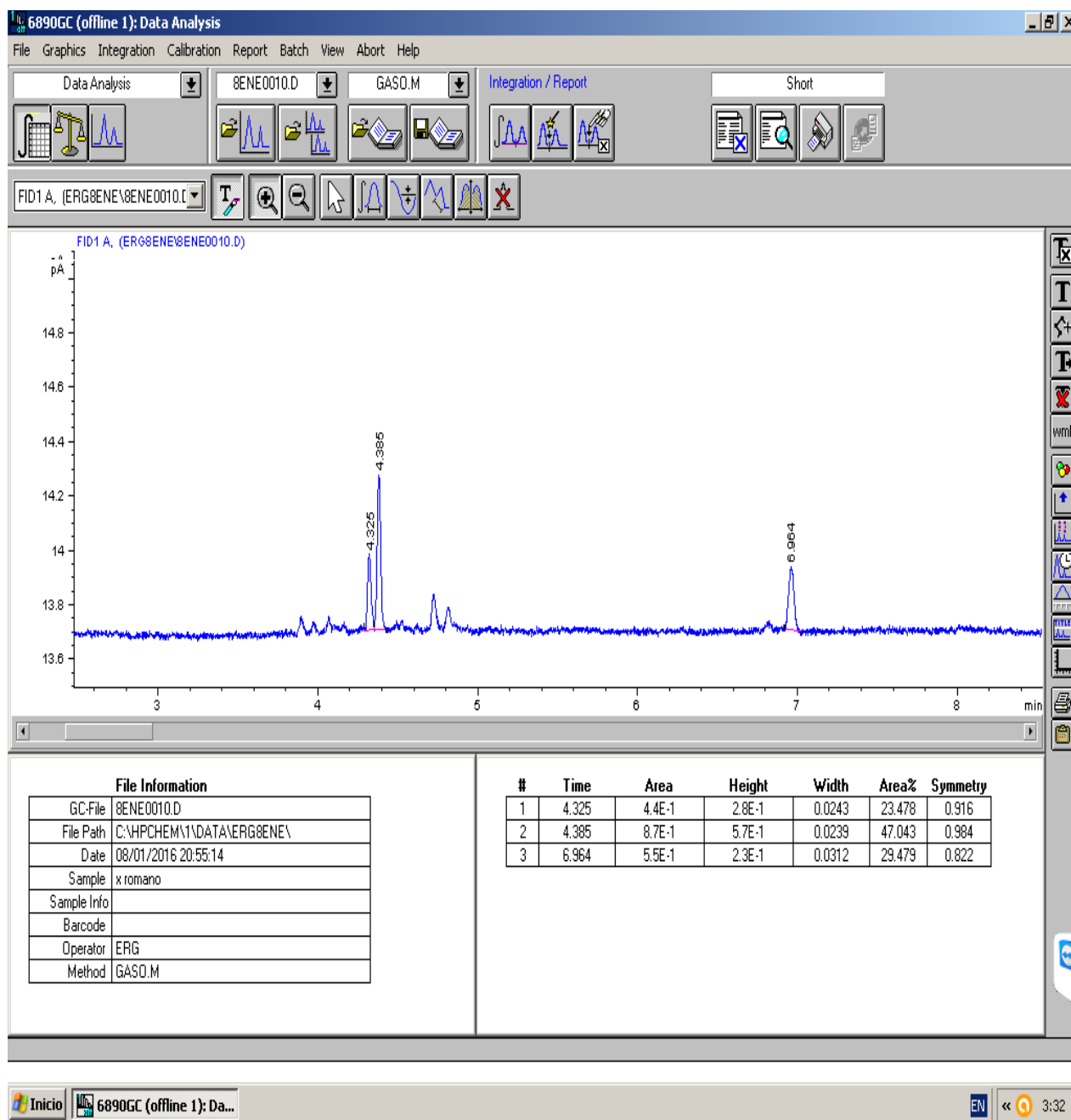
Figura 91. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

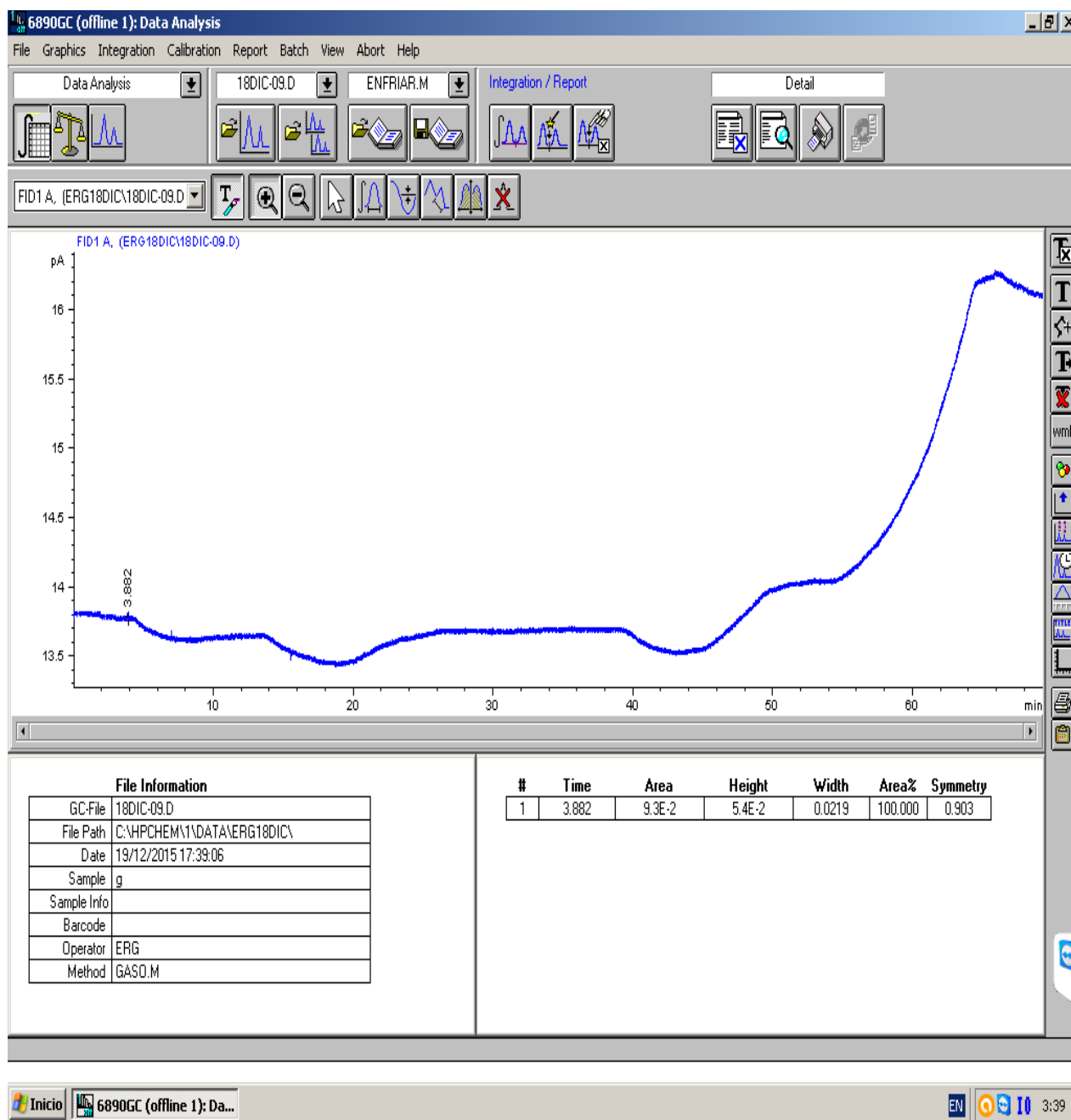
Figura 92. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias sin nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifica el benceno únicamente.

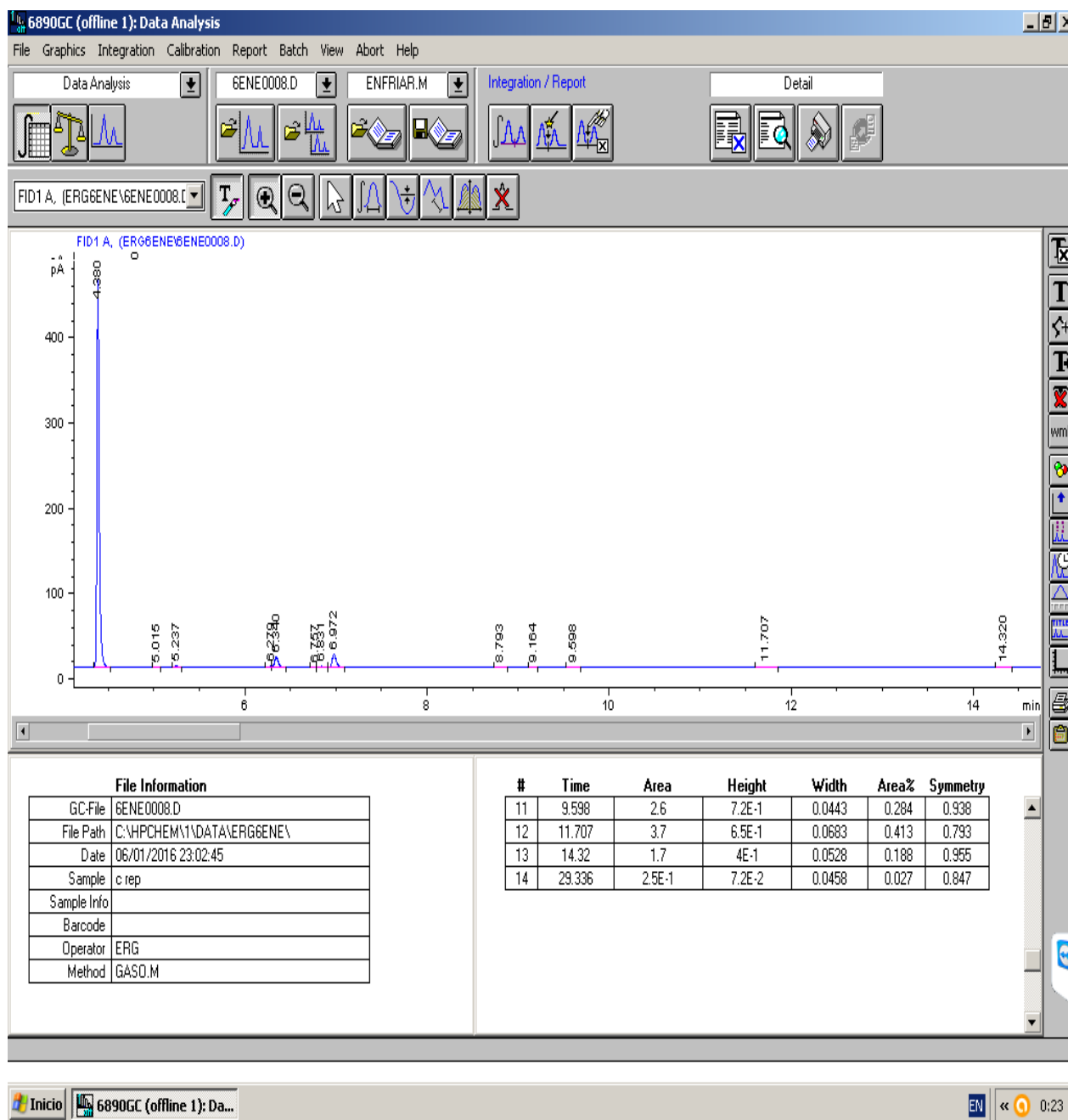
Figura 93. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior no se identifica algún compuesto que sea tóxico.

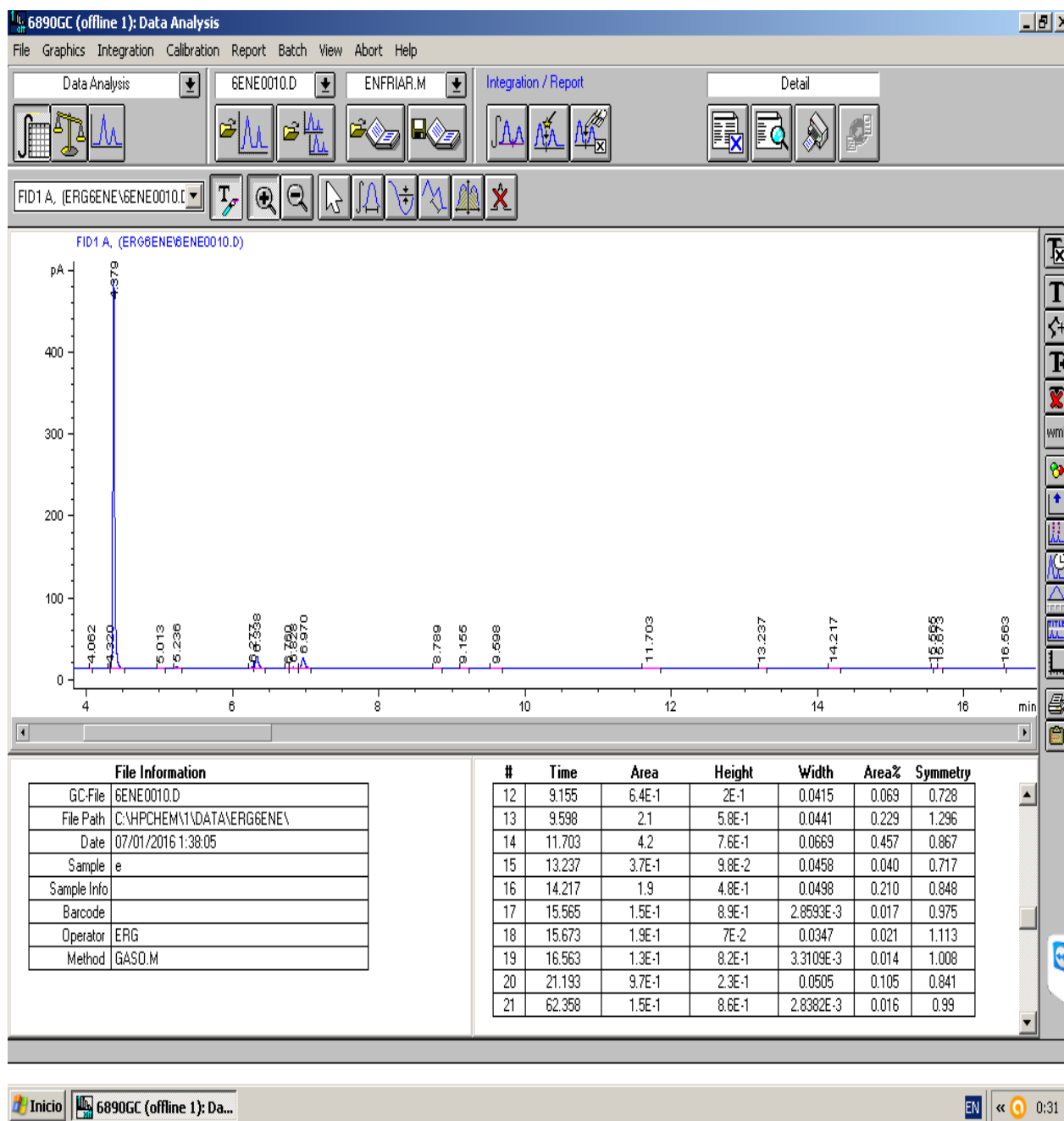
Figura 94. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno y tolueno.

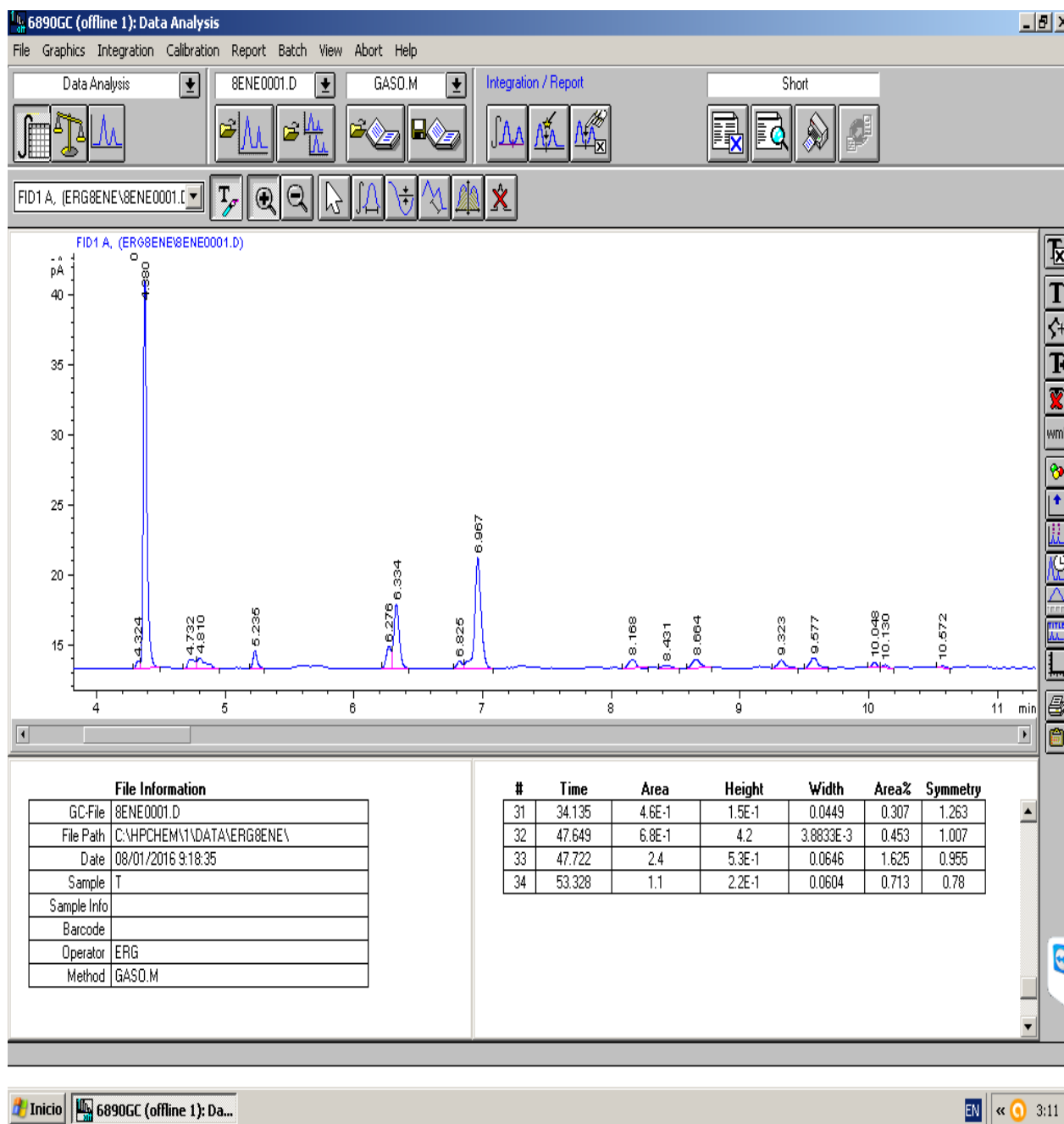
Figura 95. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y o-xileno.

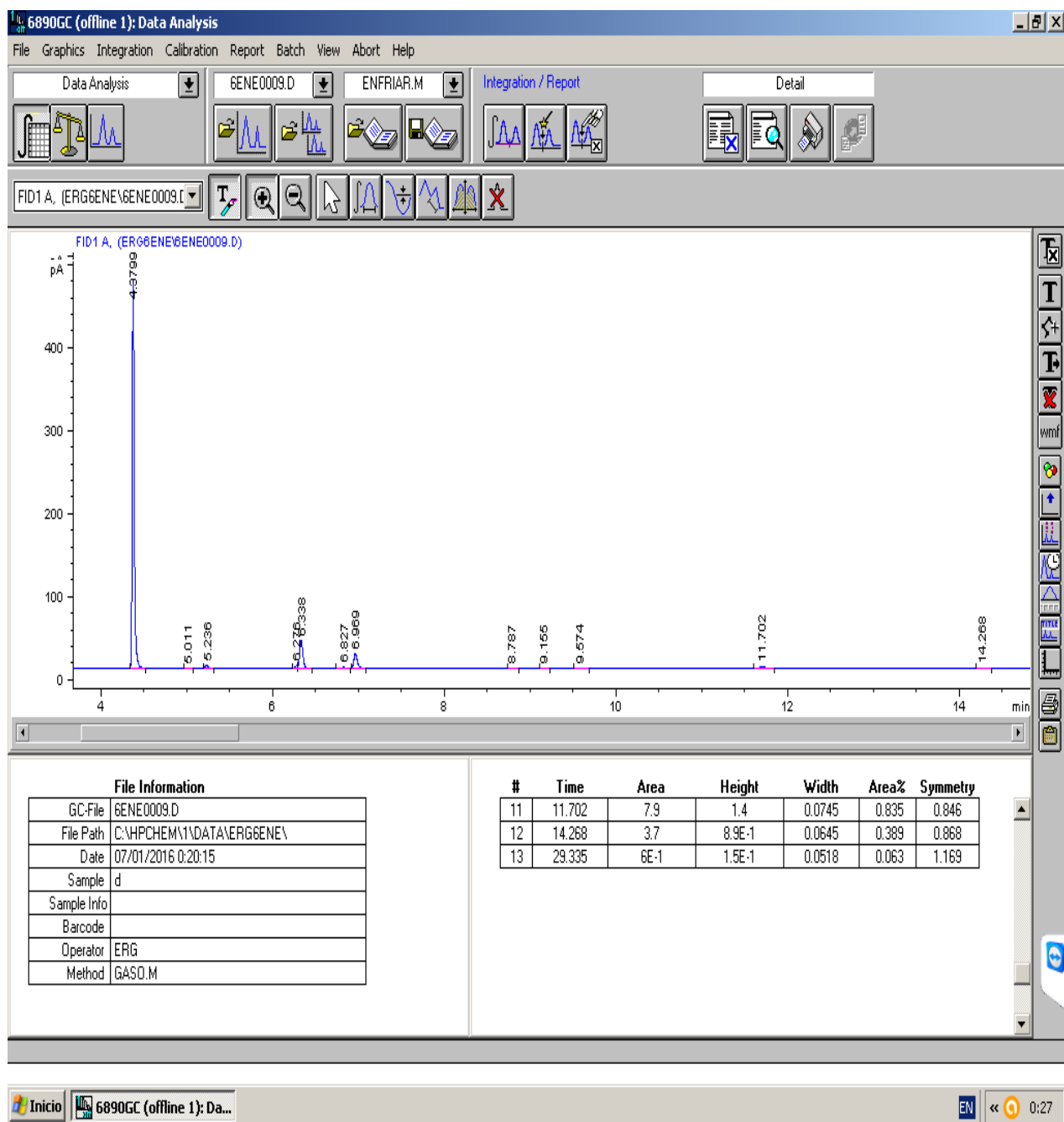
Figura 96. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y o-xileno.

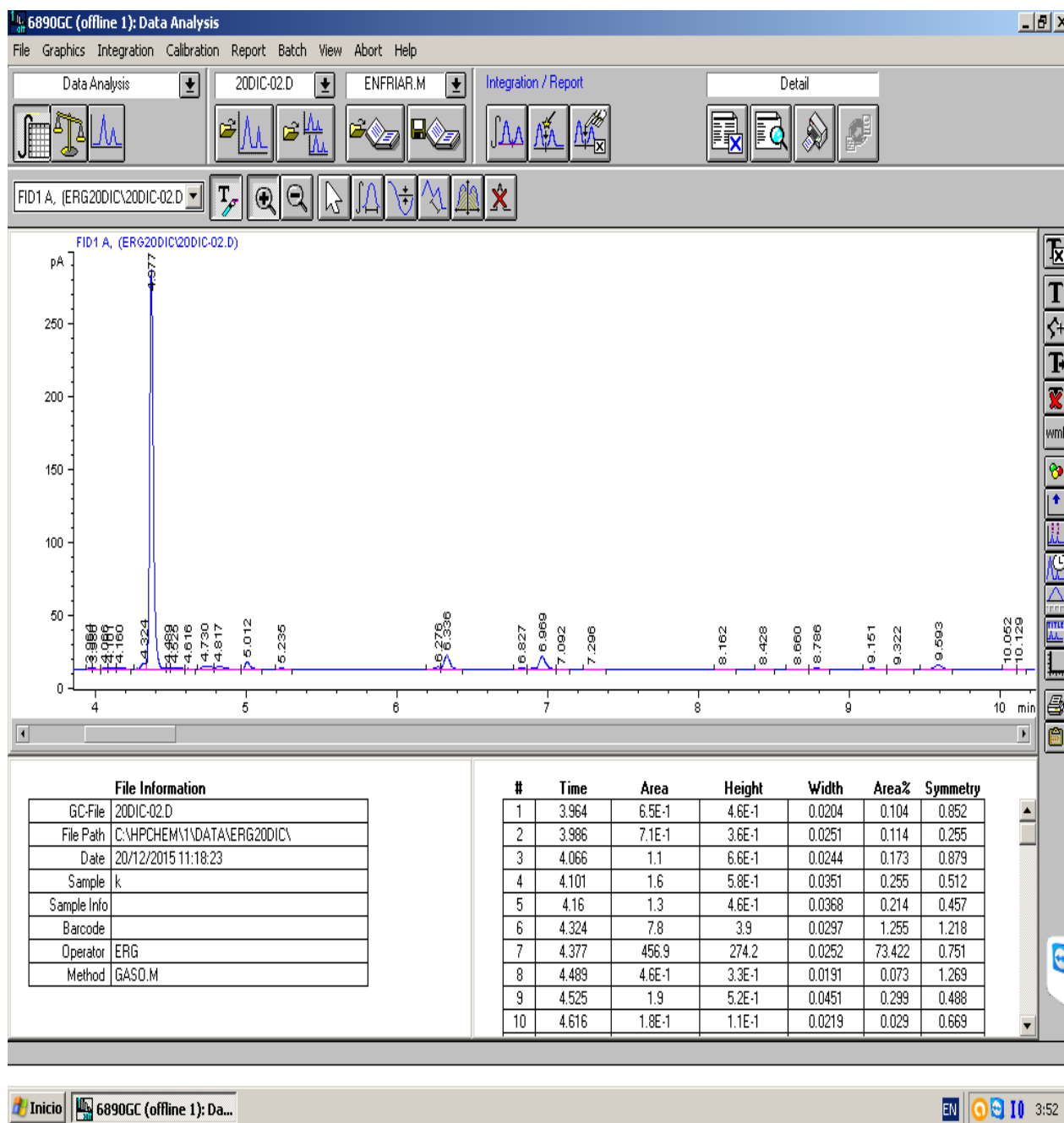
Figura 97. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 15% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno y tolueno.

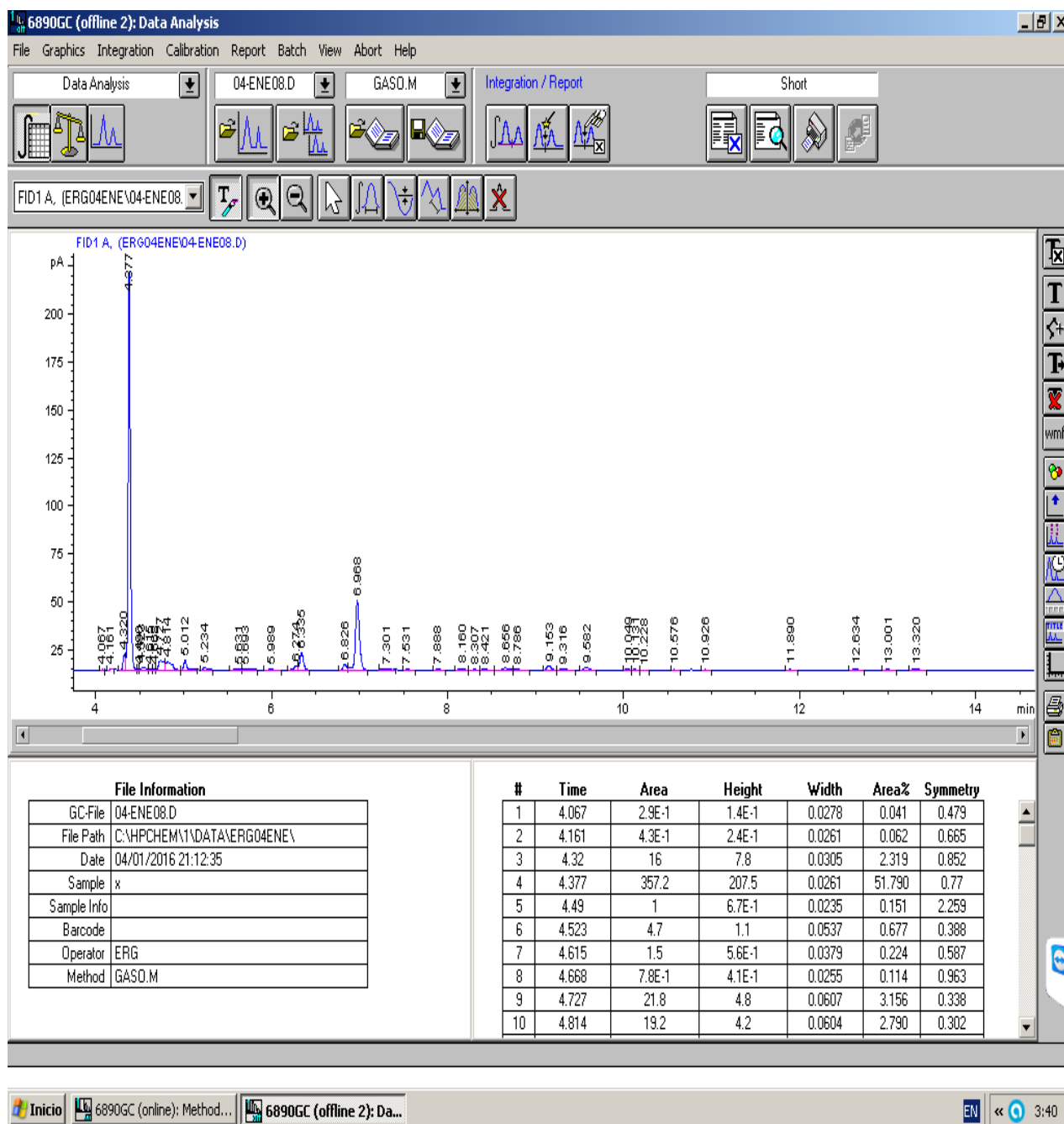
Figura 98. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

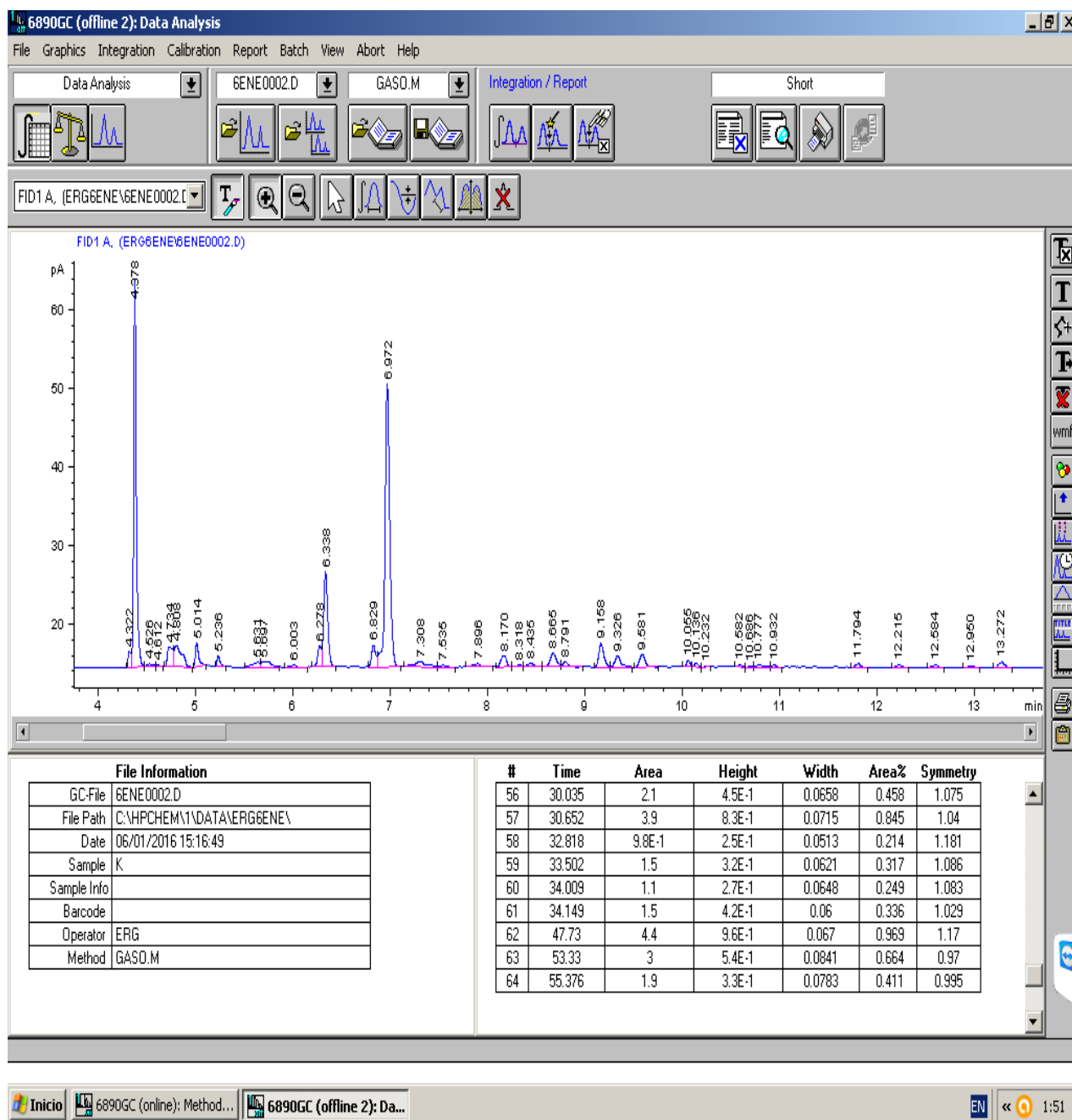
Figura 99. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, ciclohexano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

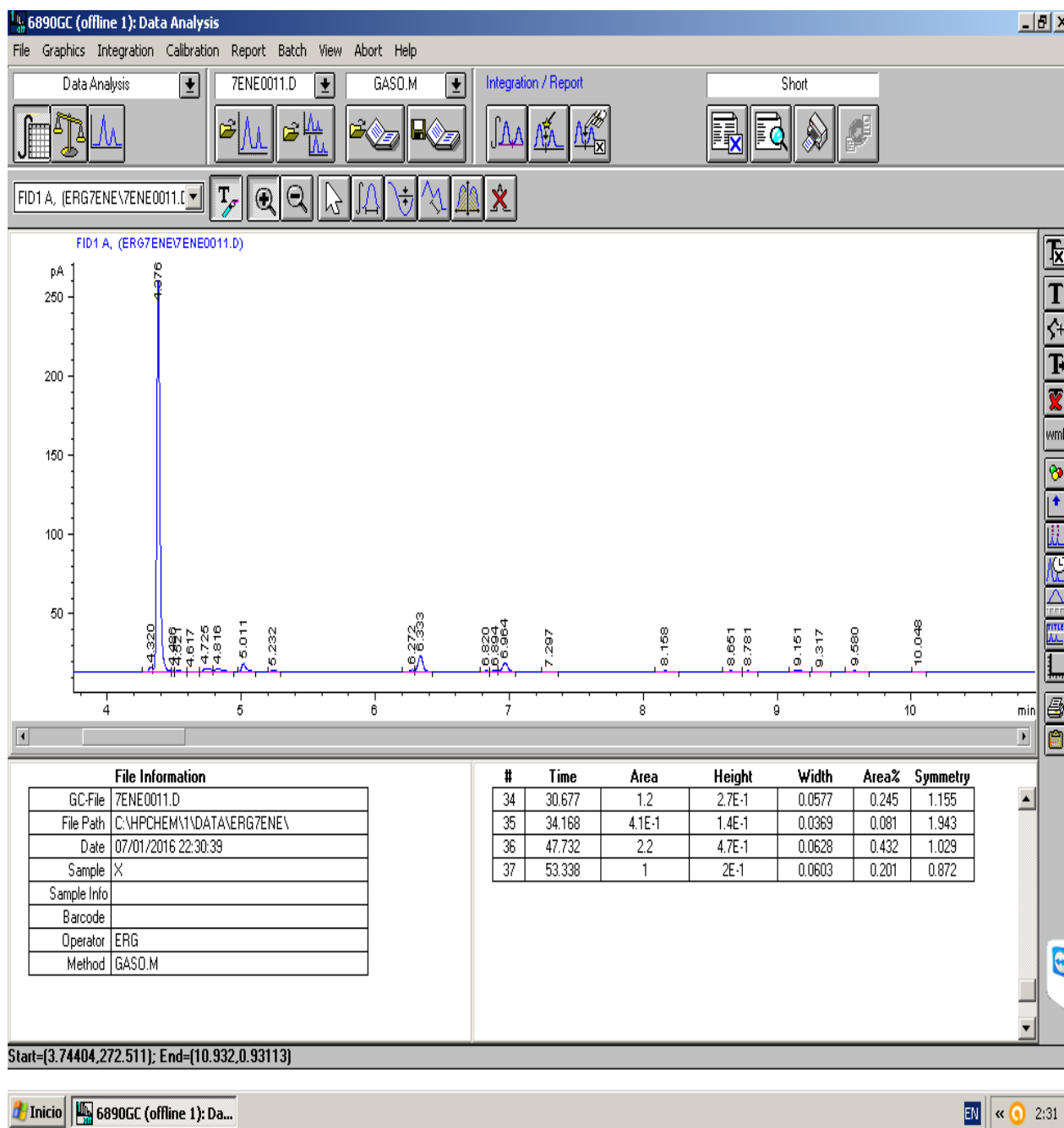
Figura 100. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos p y o.

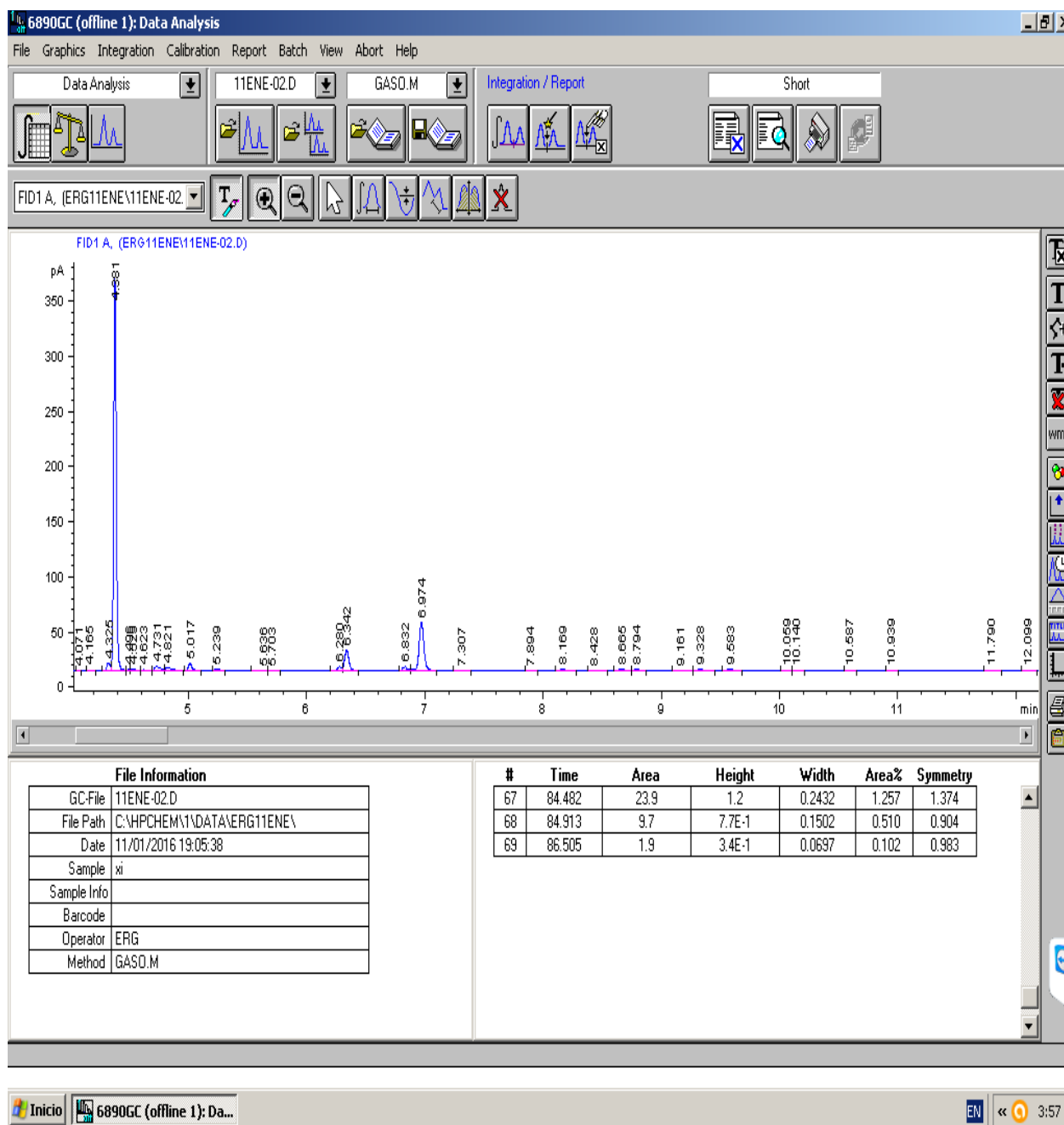
Figura 101. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m y o.

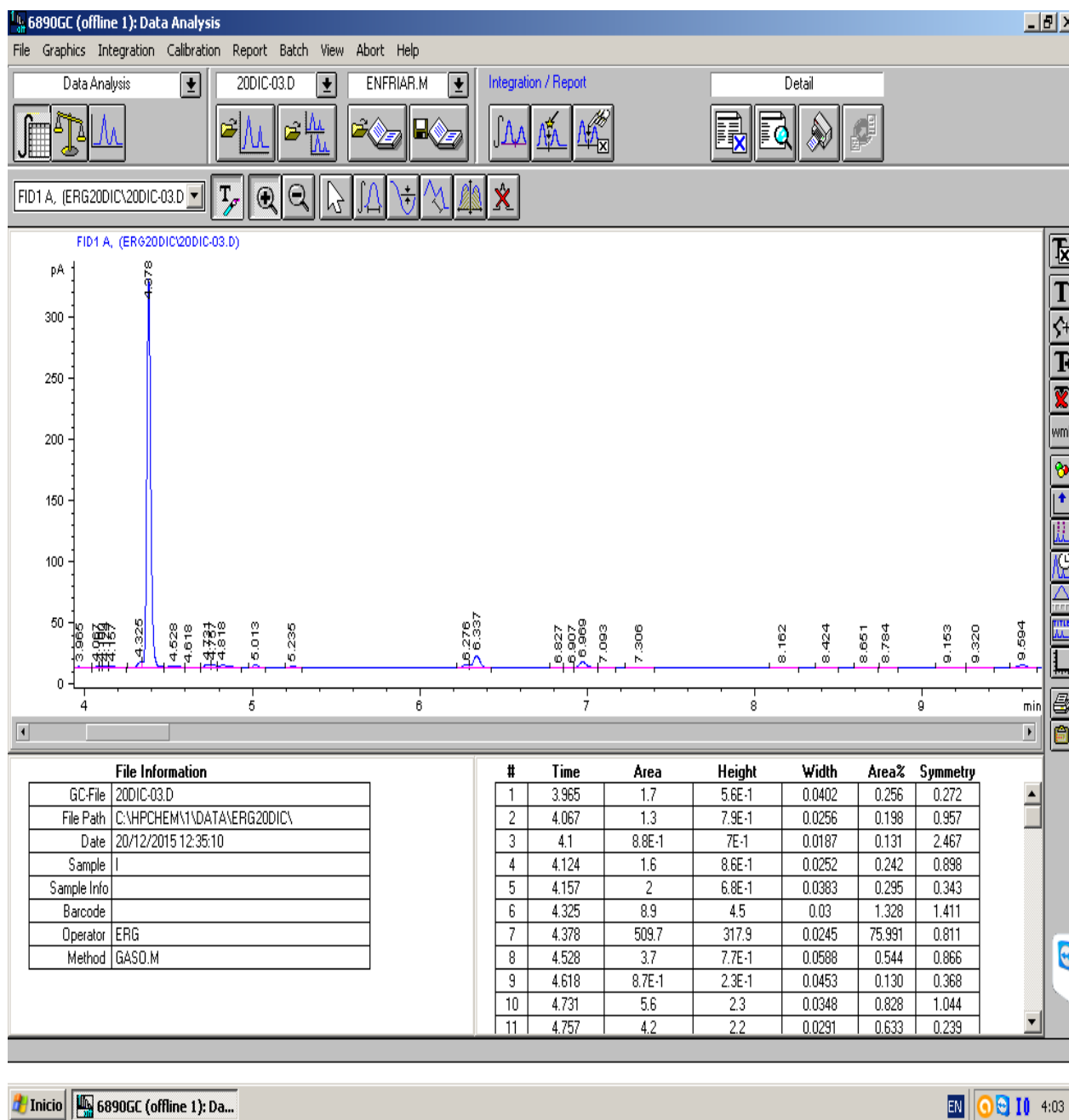
Figura 102. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 25% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-heptano, benceno y tolueno.

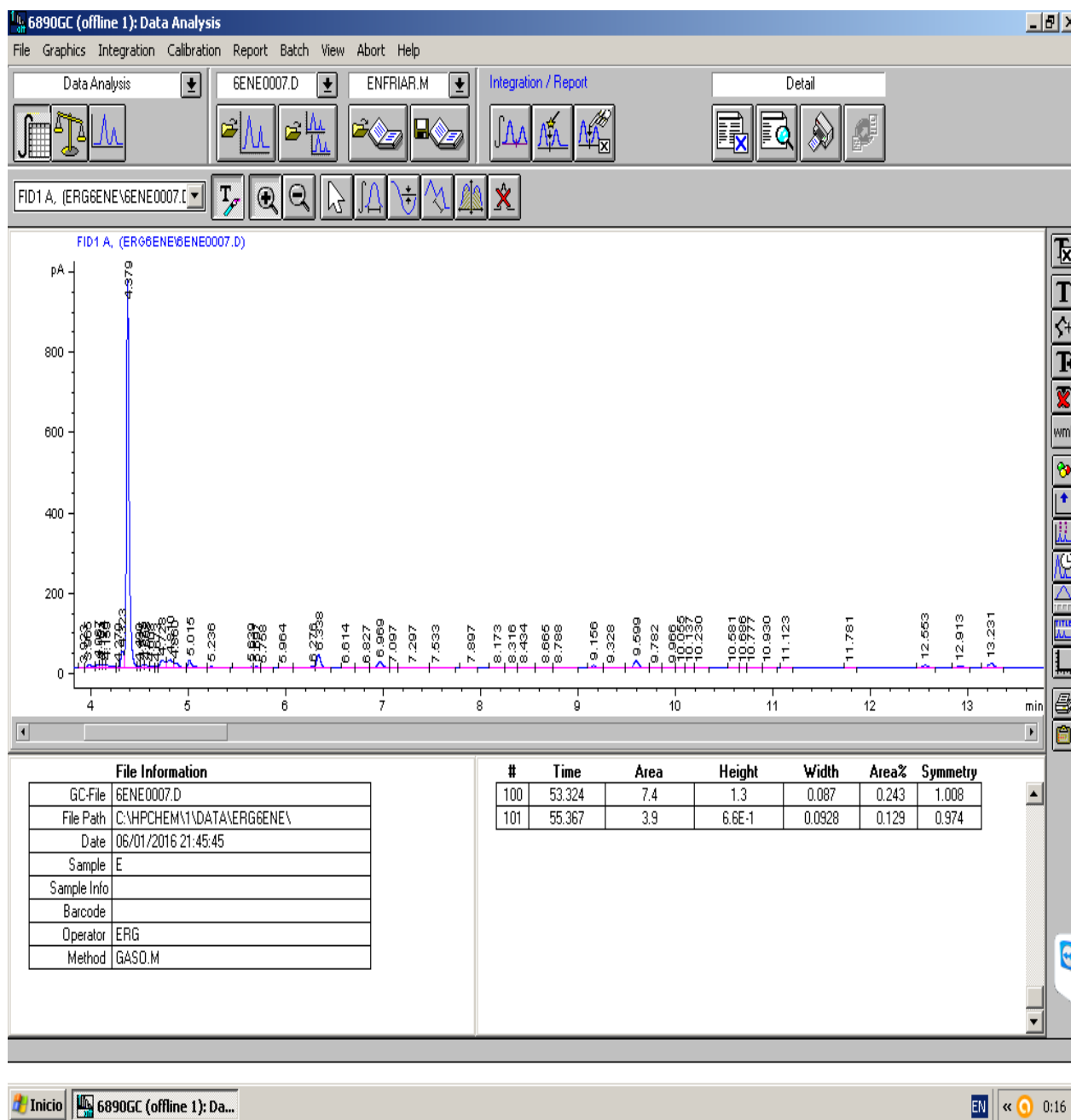
Figura 103. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

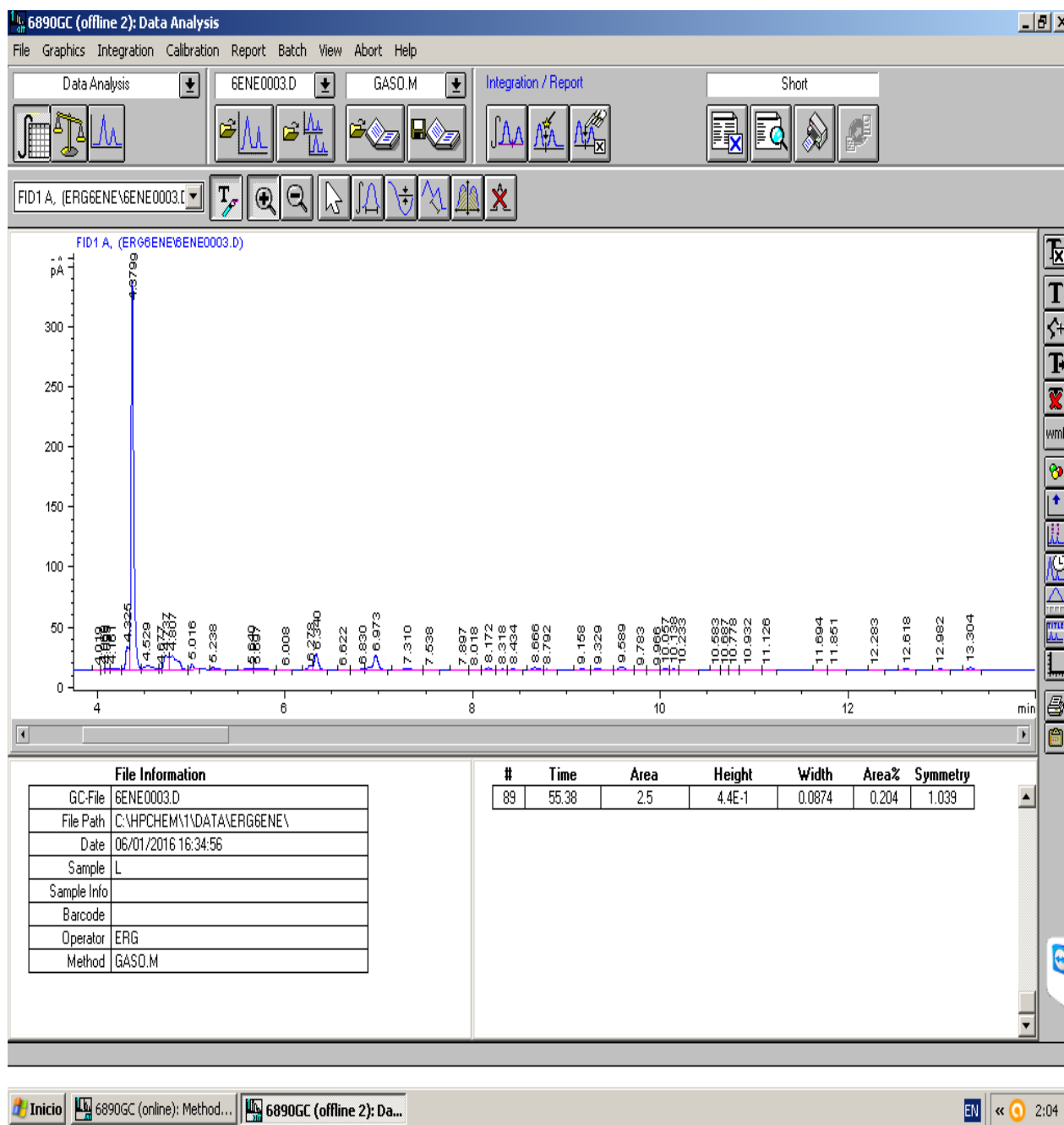
Figura 104. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

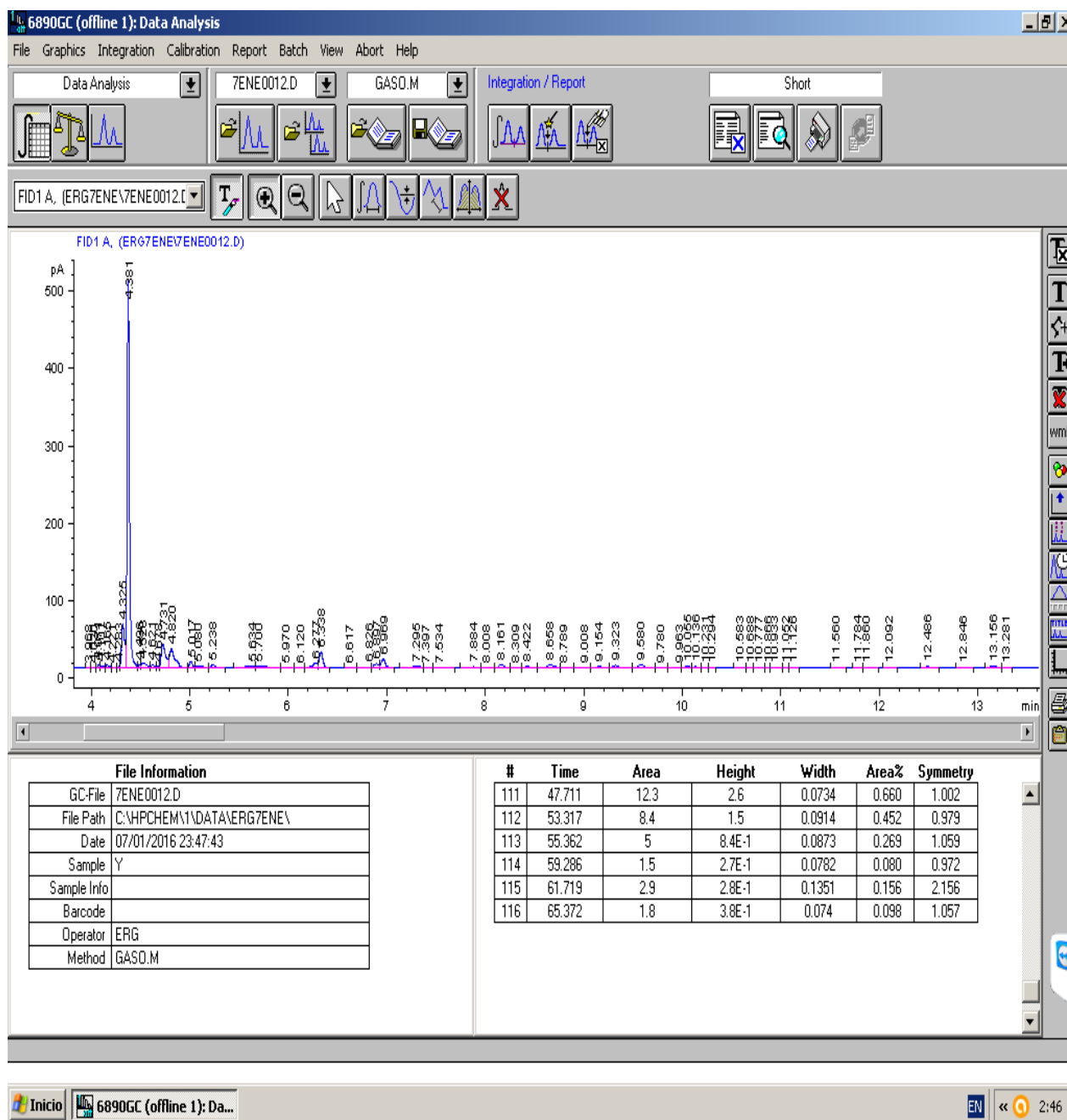
Figura 105. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

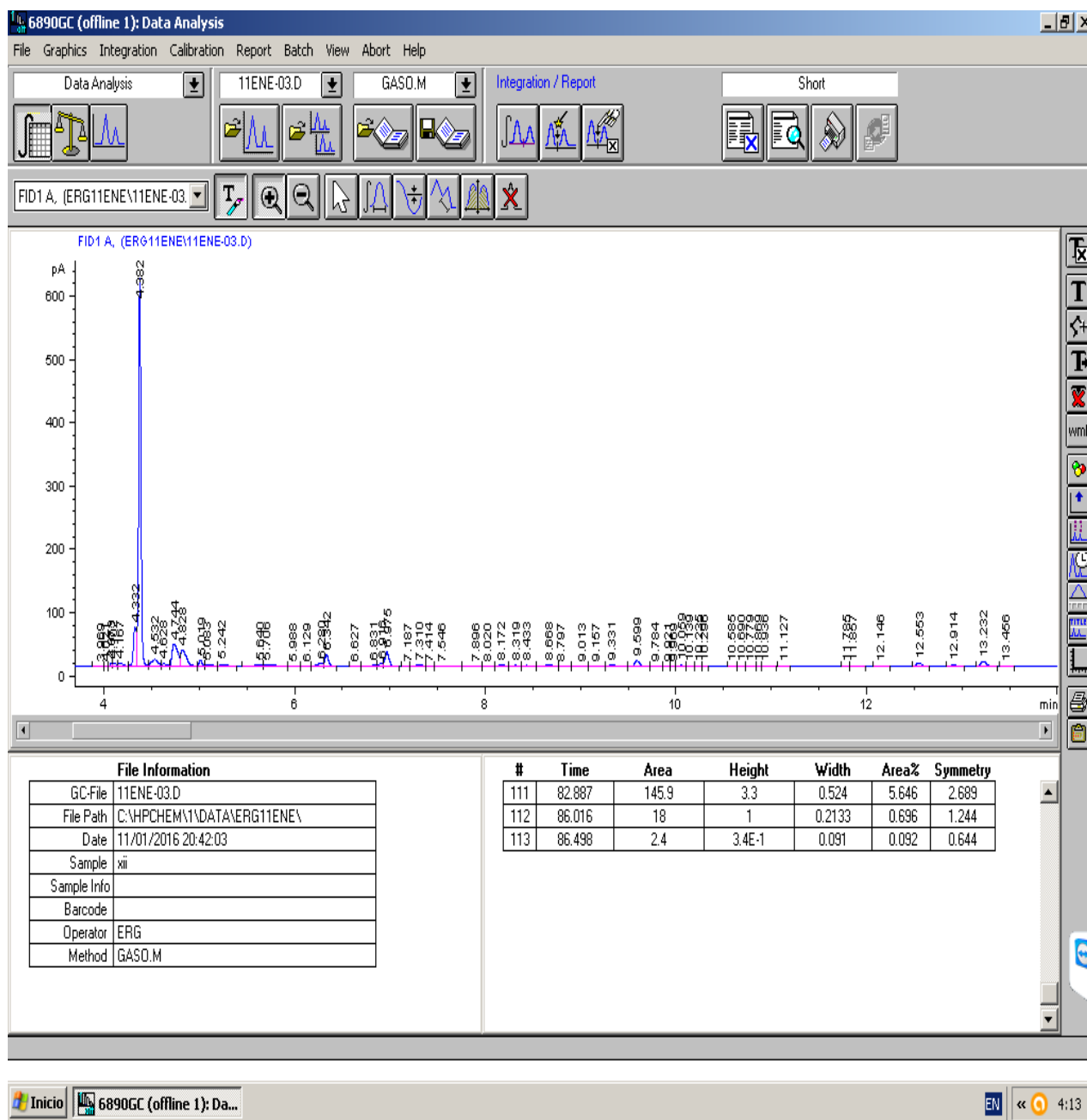
Figura 106. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y o-xileno.

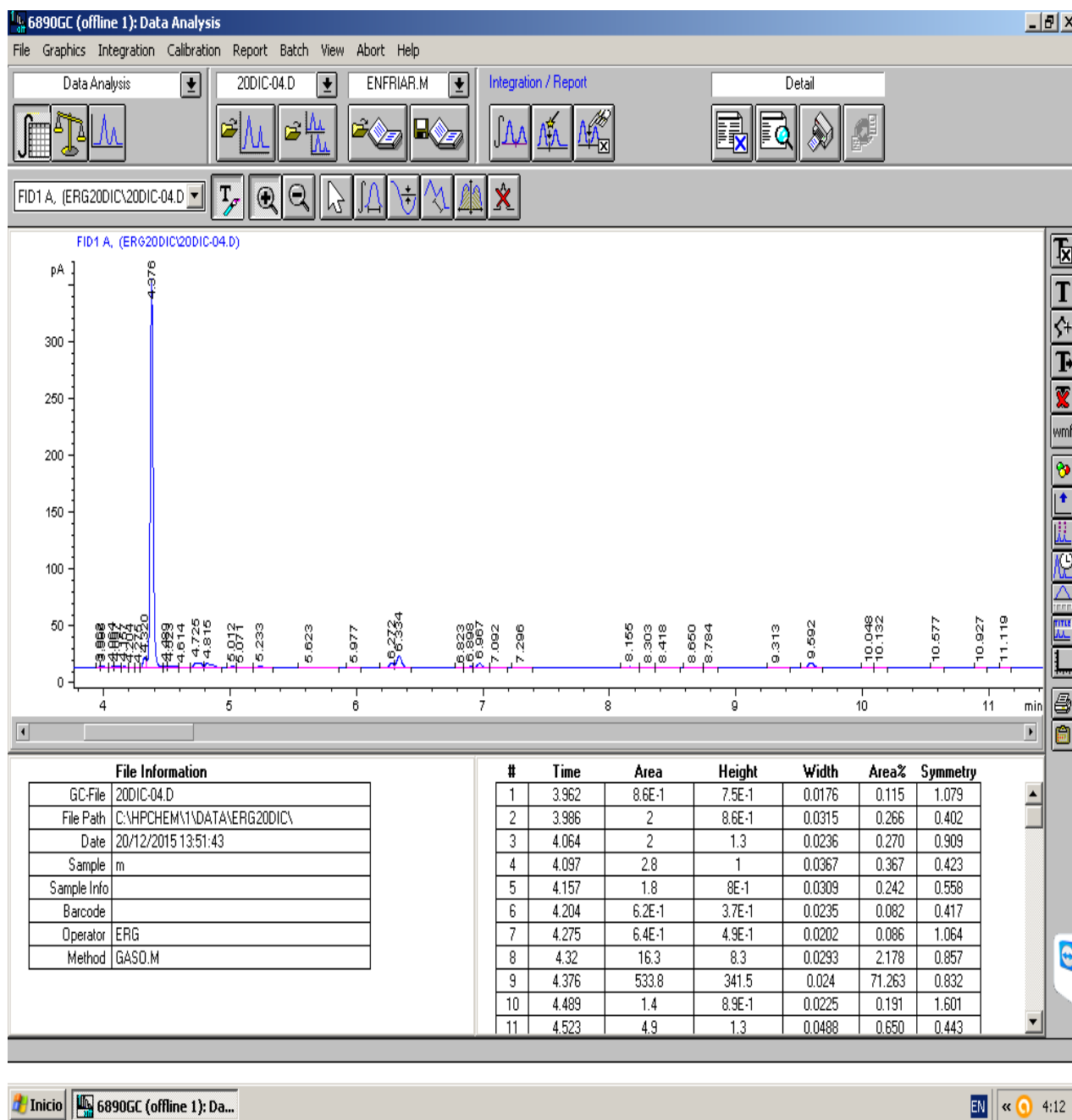
Figura 107. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 35% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

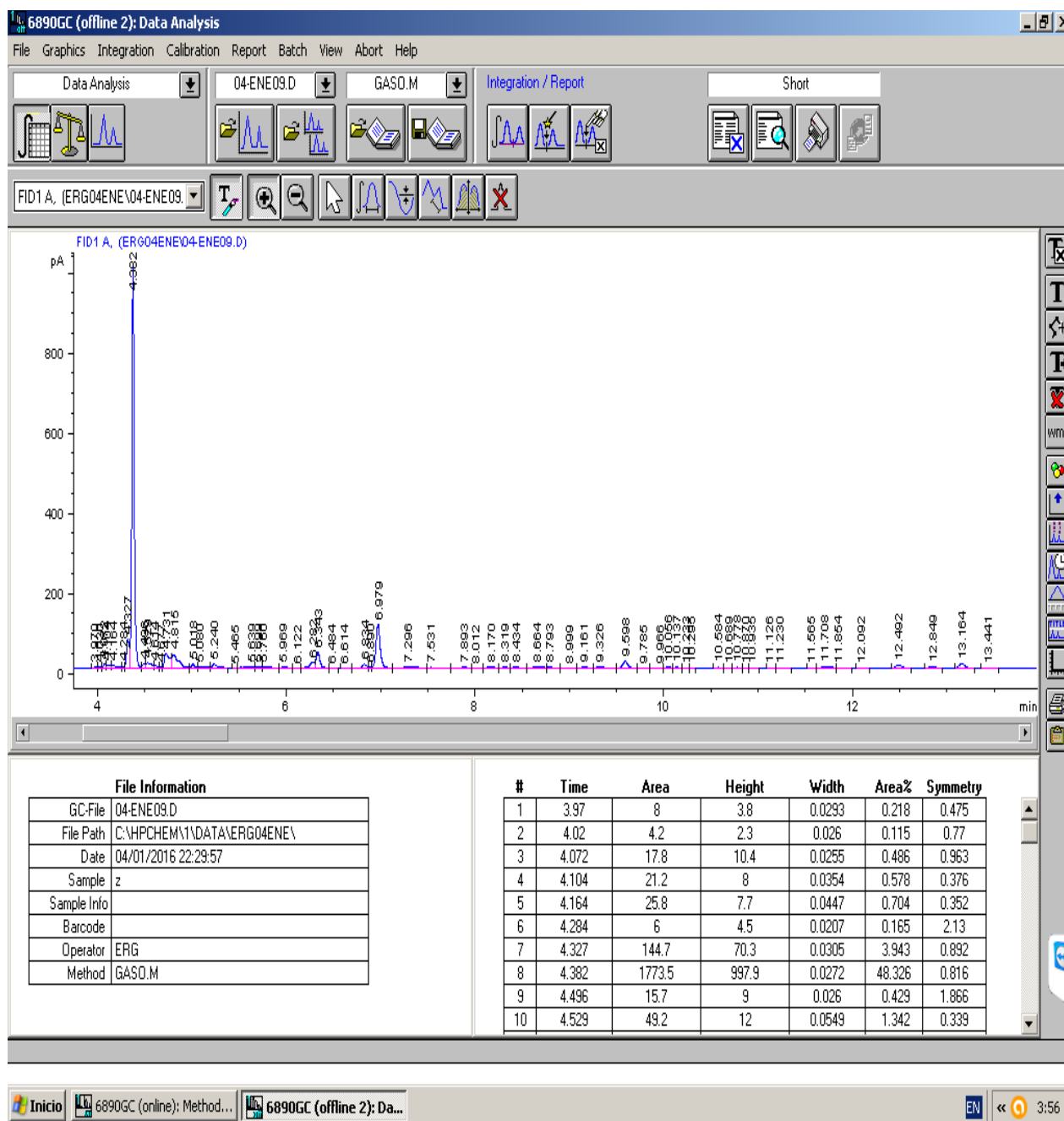
Figura 108. Cromatograma de muestreo del día 0 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos m, p y o.

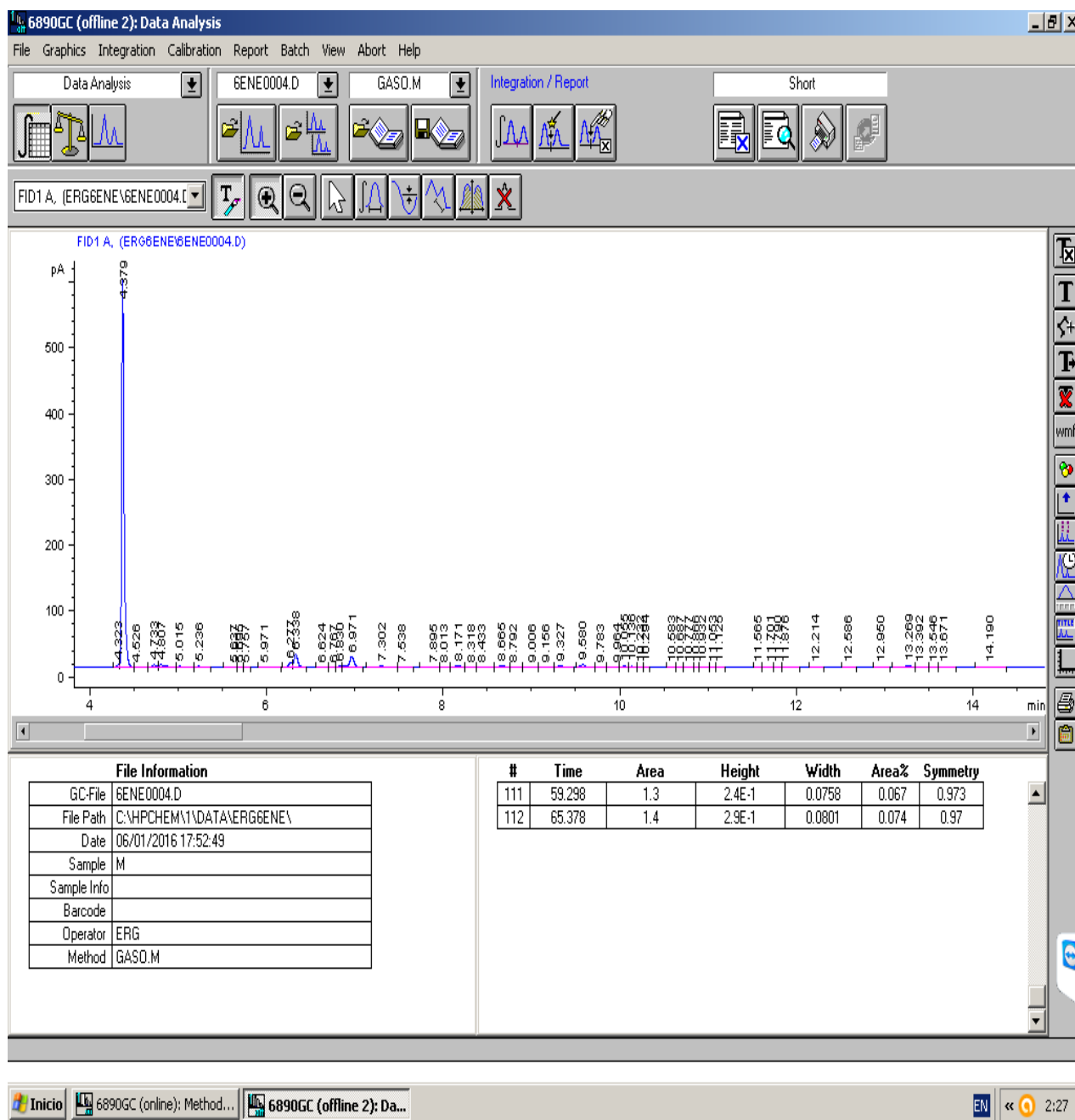
Figura 109. Cromatograma de muestreo del día 7 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-pentano, n-hexano, n-heptano, benceno y tolueno.

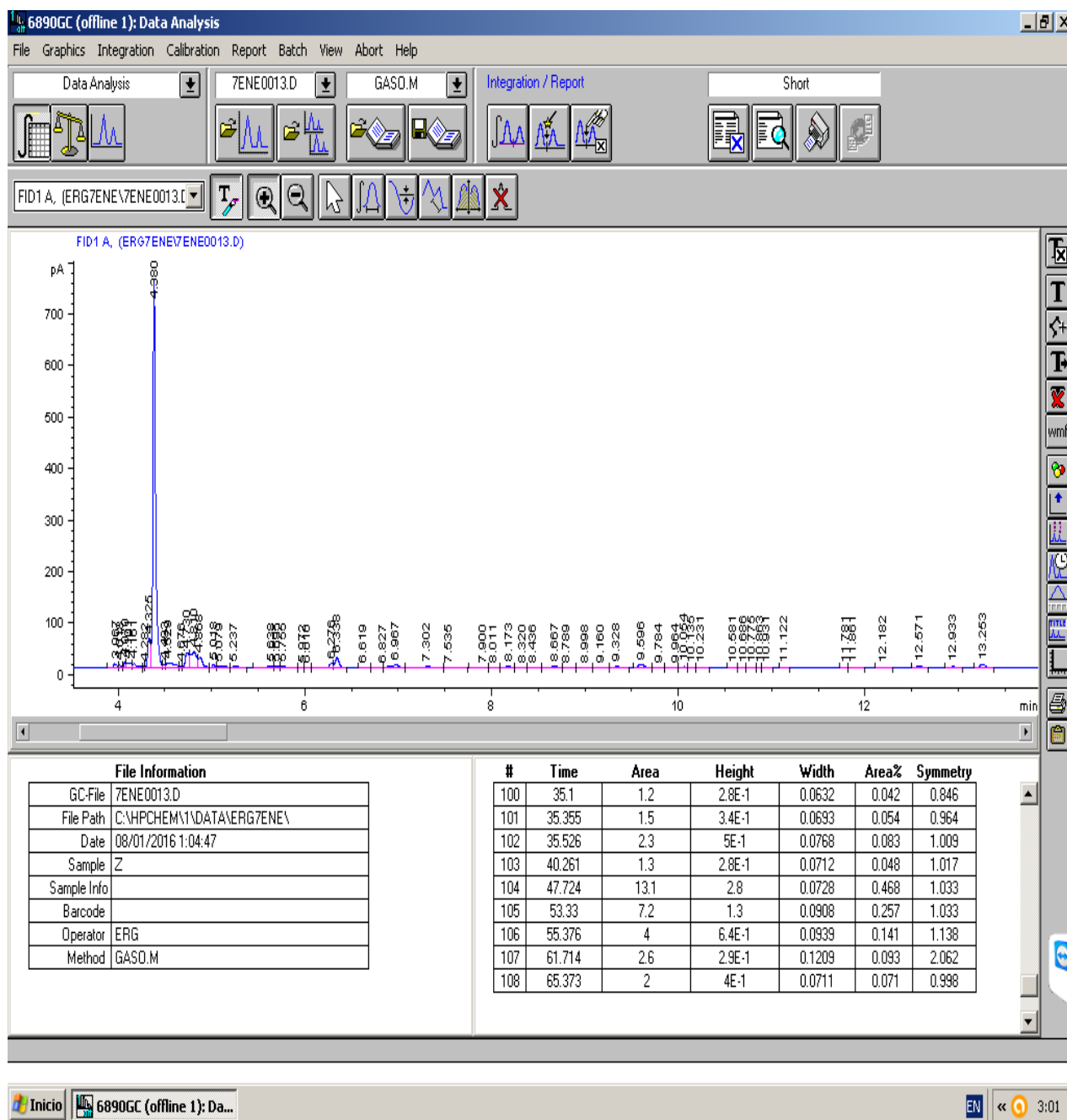
Figura 110. Cromatograma de muestreo del día 14 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el benceno, tolueno y los xilenos p y o.

Figura 111. Cromatograma de muestreo del día 21 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina.



Fuente: ChemStation 10.01

En el cromatograma anterior se identifican el n-hexano, n-heptano, benceno, tolueno y los xilenos p y o.

Figura 112. Cromatograma de muestreo del día 28 con bacterias con nanojets al 45% de gasolina.

